

Bittere Diketopiperazine und Chlorogensäurederivate in Röstkaffee

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von

Michael Ginz

aus Bremen

1. Referent

apl. Prof. Dr. U. H. Engelhardt

2. Referent

Prof. Dr. P. Winterhalter

eingereicht am

27.03.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am

22.06.2001

Druckjahr

2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

M. Ginz und U. H. Engelhardt; Bitterstoffe im Kaffee;
Lebensmittelchemie 1999, 53, S.150

M. Ginz und U. H. Engelhardt; Identification of proline-based diketopiperazines in roasted coffee;
J. Agric. Food Chem. 2000, 48, S.3528-3532

M. Ginz und U. H. Engelhardt; Identification of new diketopiperazines in roasted coffee;
Eur. Food Res. Technol. 2001, 213, S.8-11

Tagungsbeiträge

M. Ginz, S. Erny, A. Degenhardt und U. H. Engelhardt; Synthesis, Isolation and Identification of diketopiperazines in roasted coffee proteins;
Proceedings of the 6th Wartburg Aromasymposium 2000, in press

M. Ginz und U. H. Engelhardt; Analysis of bitter fractions of roasted coffee by LC-ESI-MS - new chlorogenic acid derivatives;
Proceedings of the 19th ASIC Colloquium (Triest) 2001, in press

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1998 bis Dezember 2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt für die Betreuung der Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft sowie seine Vorschläge und Ideen, vorallem aber der mir gewährte große Freiraum haben sehr zum Erfolg der Arbeit beigetragen. Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken. Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. H. G. Maier. Seine weitreichende wissenschaftliche Erfahrung mit Kaffee habe ich in einer Vielzahl von angenehmen Diskussionen zu schätzen gelernt. Besonders aber auch sein persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit habe ich als sehr angenehm empfunden.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschung (AIF), dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) und dem Ministerium für Wirtschaft und Technologie (AIF-FV; 11793N) danke ich für die Finanzierung der Arbeit, Herrn Dr. Wilkens von der Firma Tchibo für die Bereitstellung von Röstkaffeeproben, sowie Herrn Dr. Bradbury und Dr. Balzer von der Firma Kraft Foods für die Möglichkeit der Messung von GC-MS Proben in ihrem Labor. Tanja Bormann, Denise Distler, Markus Sefrin, Daniela Grotewahl und Astrid Burmeister danke ich für die im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlußarbeiten geleisteten Beiträge zu der vorliegenden Arbeit. Bernd Bonnländer danke ich für die stete Hilfsbereitschaft in allen Fragen rund um Soft- und Hartware und Carsten Hüttermann für die schnelle und kritische Korrektur dieser Arbeit. Für die harmonische und humorvolle Zeit im Teelabor gebührt mein Dank meinen Kollegen Beate Maiwald und Olaf Pokorny. Allen Kollegen und Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelchemie möchte ich für eine im allgemeinen sehr positive und von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägten Zeit danken.

Mein besonderer Dank gebührt Silke Giesa für die unaufhörliche seelische Unterstützung nicht nur in den Tiefpunkten der Kaffeeforschung. Abschließend möchte ich meinen Eltern danken. Durch Ihre langjährige Unterstützung und Förderung ist diese Arbeit überhaupt erst möglich geworden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines über Kaffee.....	1
1.1.1	Wirtschaftliche Bedeutung.....	1
1.1.2	Botanik und Anbauggebiete.....	2
1.1.3	Ernte und Aufbereitung.....	4
1.1.4	Röstverfahren.....	7
1.2	Inhaltsstoffe des Kaffees.....	8
1.2.1	Übersicht über die Zusammensetzung von grünem und geröstetem Kaffee.....	8
1.2.2	Sensorisch relevante Inhaltsstoffe.....	10
1.2.2.1	Aromastoffe.....	10
1.2.2.2	Geschmacksstoffe.....	12
1.3	Bitterkeit.....	13
1.3.1	Struktur von Bitterstoffen.....	14
1.3.1.1	Natürlich vorkommende Bitterstoffe.....	15
1.3.1.2	Bitterstoffe in erhitzten Lebensmitteln.....	16
1.3.2	Modellvorstellung des Bitterstoffrezeptors und der generellen Wahrnehmung von bitterem und süßem Geschmack.....	19
1.3.3	Bitterstoffe im Kaffee – bisherige Erkenntnisse.....	25
1.4	Problemstellung.....	27
2	Ergebnisse und Diskussion.....	29
2.1	Diketopiperazine in geröstetem Kaffee.....	29
2.1.1	Isolierung und Röstung von Rohkaffee-Proteinen.....	29
2.1.1.1	Isolierung wasserlöslicher Rohkaffee-Proteine.....	29
2.1.1.1.1	Bestimmung des Proteingehalts.....	32
2.1.1.1.2	Gelelektrophoretische Analyse.....	34
2.1.1.2	Röstung von Rohkaffee-Proteinen.....	36
2.1.2	Nachweis von Diketopiperazinen in gerösteten Kaffee-Proteinen.....	38
2.1.2.1	Fraktionierung der gerösteten Proteine.....	39
2.1.2.2	LC-ESI-MS Analyse.....	40
2.1.2.2.1	Analyse der Gelchromatographie-Fractionen über LC-ESI-MS.....	41

2.1.2.3	Nachweis von Diketopiperazinen über GC-EI-MS	48
2.1.3	Nachweis von Diketopiperazinen in Röstkaffee	50
2.1.3.1	Allgemeine Röstkaffee-Fraktionierung	50
2.1.3.2	Fraktionierung zum Nachweis von Diketopiperazinen in Röstkaffee	53
2.1.3.3	LC-ESI-MS Analyse	54
2.1.3.4	GC-EI-MS Analyse	56
2.1.4	Quantifizierung von Diketopiperazinen in Röstkaffees	57
2.1.4.1	Quantifizierung mittels LC-ESI-MS	57
2.1.4.1.1	Grundlagen der Methode	57
2.1.4.1.2	Methodenentwicklung	60
2.1.4.1.3	Kalibrierung und Reproduzierbarkeit	62
2.1.4.1.4	Probenaufarbeitung	64
2.1.4.1.5	Diketopiperazin-Gehalte in Handelskaffees und Espresso	67
2.1.4.1.6	Entwicklung der Diketopiperazine mit zunehmendem Röstgrad	69
2.1.4.2	Quantifizierung mittels GC-FID	71
2.1.4.2.1	Methodenentwicklung	71
2.1.4.2.2	Methodenparameter	73
2.1.4.2.3	Quantifizierung in Handelskaffees und der Röstserie	73
2.1.5	Synthese von Diketopiperazinen	73
2.1.5.1	Chemische Synthese von cis-Diketopiperazinen	74
2.1.5.1.1	Synthese von Benzyloxycarbonyl-[Z]-amino-säuren	75
2.1.5.1.2	Synthese von Aminosäurenmethylester	76
2.1.5.1.3	Synthese von Z-geschützten Dipeptidmethylestern und Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-[Z]-Schutzgruppe	76
2.1.5.1.4	Synthese von Diketopiperazinen	77
2.1.5.2	Synthese von Diketopiperazinen über Röstung von Aminosäuren	78
2.1.5.2.1	Isolierung mittels semipräparative RP-HPLC	79
2.1.5.2.2	Isolierung mittels High-Speed Countercurrent Chromatography	80
2.1.6	Nachweis weiterer Diketopiperazine in Röstkaffee	81
2.1.7	Sensorische Analyse	84
2.1.7.1	Aufbau und Training des Sensorik-Panels	85
2.1.7.2	Minimierung der Probenmenge	87
2.1.7.3	Sensorische Analyse der Diketopiperazine	87
2.1.8	Schlußfolgerung	90

2.2	Chlorogensäure-Derivate in geröstetem Kaffee.....	92
2.2.1	Fraktionierung des Methanol-Eluats.....	92
2.2.1.1	Screening mit RP-HPLC-DAD.....	93
2.2.1.2	LC-ESI-MS Analyse.....	94
2.2.2	Modellröstung von Chlorogensäuren	97
2.2.2.1	Modellröstung der 5-CQA.....	97
2.2.2.1.1	LC-ESI-MS Analyse.....	97
2.2.2.1.2	Präparative Isolierung der Lactone.....	99
2.2.2.1.3	Strukturaufklärung und postulierter Bildungsmechanismus der einzelnen Caffeoyl-Chinasäurelacton-Isomere.....	100
2.2.2.2	Modellröstung der Feruloyl-Chinasäure-Isomere und präparative Isolierung der Lactone.....	104
2.2.2.3	Weitere Modellversuche.....	105
2.2.3	Nachweis von Chlorogensäurelactonen in Röstkaffee.....	106
2.2.3.1	Alternative Fraktionierung.....	106
2.2.3.2	Präparative Isolierung der Chlorogensäurelactone aus Röstkaffee.....	107
2.2.3.3	Schlußfolgerung.....	109
2.2.4	Sensorische Analyse der Chlorogensäurelactone.....	110
2.2.5	Nachweis weiterer Chlorogensäure-Derivate.....	111
2.2.5.1	LC-ESI-MS Analyse.....	111
2.2.5.2	Synthese von Chlorogensäure-Methylestern	113
2.2.5.3	Überprüfung auf Artefakt-Bildung.....	115
2.2.5.4	Isolierung und Struktur-Aufklärung.....	115
3	Zusammenfassung.....	117
4	Material und Methoden.....	120
4.1	Kaffee und Chemikalien.....	121
4.1.1	Verwendeter Kaffee.....	121
4.1.2	Chemikalien.....	121
4.2	Semipräparative Arbeiten.....	122
4.2.1	Geräte und Methoden.....	122
4.2.1.1	Röster.....	122
4.2.1.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	122

4.2.1.3	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	126
4.2.1.4	Gaschromatographie (GC)	126
4.2.1.5	Massenspektren (MS).....	126
4.2.1.6	Kernresonanzspektren (NMR).....	128
4.2.1.7	Säulenchromatographie (SC).....	128
4.2.1.7.1	Gelpermeationschromatographie	128
4.2.1.7.2	Polyamidsäulenchromatographie.....	130
4.2.1.8	Gelelektrophorese.....	130
4.2.1.8.1	Trennung der Proteine der wasserlöslichen Rohkaffee-Protein Isolierung ..	130
4.2.1.8.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blau.....	132
4.3	Aufarbeitungen und Probenvorbereitungen.....	133
4.3.1	Isolierung von Rohkaffee-Proteinen.....	133
4.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes.....	133
4.3.3	Modellröstung.....	135
4.3.4	Allgemeine Röstkaffee-Fraktionierung.....	133
4.3.5	Fraktionierung zum Nachweis von Diketopiperazinen in Röstkaffee.....	135
4.3.6	Alternative Röstkaffee-Fraktionierung.....	135
4.4	Quantitative Bestimmungen.....	136
4.4.1	Quantifizierung von Diketopiperazinen in Röstkaffee.....	136
4.4.1.1	Probenaufarbeitung.....	136
4.4.1.2	Kalibrierung und Reproduzierbarkeit.....	137
4.4.1.3	Methodenparameter.....	137
4.5	Synthesen.....	138
4.5.1	Chemische Synthese von cis-Diketopiperazinen.....	138
4.5.1.1	Synthese von Benzyloxycarbonyl-[Z]-amino-säuren.....	138
4.5.1.2	Synthese der Aminosäuremethylesterhydrochloride.....	139
4.5.1.3	Synthese der Z-geschützten Dipeptidmethylester.....	141
4.5.1.4	Synthese der Dipeptidmethylester durch Hydrogenolyse.....	143
4.5.1.5	Synthese der Diketopiperazine.....	145
4.5.2	Modellröstung von Aminosäuren.....	146
4.5.3	Synthese von Chlorogensäuremethylestern.....	146
4.6	Sensorische Untersuchungen.....	146
4.6.1	Erkennung der Grundgeschmacksarten.....	147
4.6.2	Bestimmung der Schwellenwerte.....	147

4.6.3	Triangeltest.....	147
4.6.4	Rangordnungsprüfung.....	148
4.6.5	Bestimmung der Bitterkeits-Erkennungsschwelle aller Fraktionen, bzw. isolierten Substanzen.....	148
4.7	Isolierung von Feruloylchinasäuren aus Rohkaffee.....	149
5	Anhang.....	150
6	Literatur.....	176

Abkürzungsverzeichnis

aq.	wässrig
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
ca.	circa
CA	Kaffeesäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guaninmonophosphat
CD ₃ OD	deutერიertes Methanol
CTry	Caffeoyl-Tryptophan
CFQA	Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäure
CGA	Chlorogensäuren
CQA	Caffeoyl-Chinasäure
CQL	Caffeoyl-Chinasäurelacton
d	Doublett
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Doublett vom Doublett
ddd	Doublett vom Doublett vom Doublett
diCQA	Dicaffeoyl-Chinasäure
DKPs	Diketopiperazine
DMF	Dimethylformamid
D ₂ O	deutერიertes Wasser
E _s	Elektrophiles Zentrum Substrat
ESI	Electrospray Ionisation
E _r	Elektrophiles Zentrum Rezeptor
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EW	Einwaage
FA	Ferulasäure
FQA	Feruloylchinasäureester
FQL	Feruloyl-Chinasäurelacton
GC	Gaschromatographie

Gal	Galactose
Glu	Glucose
GPCR	G-Protein coupled Receptors
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
i.D.	innerer Durchmesser
IP ₃	Pyrophospho-Inositid
i.Tr.	in Trockenmasse
Int.	Intensität
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography-Electrospray-Massspectrometry
m	Multipllett
[M] ⁺	Molekülion
MeOH	Methanol
(M)Hz	(Mega)hertz
min	Minute(n)
M _{rel}	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N _s	Nukleophiles Zentrum Substrat
N _r	Nukleophiles Zentrum Rezeptor
ORV	Organischer Röstverlust
p.A.	zur Analyse
PA	Polyamid
PDE	Phosphodiesterase
ppm	Parts per Million
QA	Chinasäure
rel.	relativ
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)

RV	Röstverlust
s	Singulett
s.	siehe
SC	Säulenchromatographie
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelectrophoresis
s.o.	siehe oben
TM	Trockenmasse
TSP	Thermospray
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
z.T.	zum Teil

Symbole

Ø	Durchschnitt
λ	Wellenlänge
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
δ	chemische Verschiebung [ppm]
J	Kopplungskonstante [Hz]
s	Standardabweichung
VK	Variationskoeffizient [%]

1 Einleitung

1.1 Allgemeines über Kaffee

1.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung

1999 wurden in Deutschland 549.520 Tonnen Rohkaffee (9,16 Millionen Sack à 60 kg) verarbeitet. Bei einer Bevölkerungszahl von 82,3 Millionen ergibt sich daraus ein theoretischer Pro-Kopf-Verbrauch von 6,7 kg Rohkaffee pro Jahr. Umgerechnet auf die Bevölkerung ab 15 Jahren, die immer oder gelegentlich Kaffee trinkt, entspricht dies einem Konsum von knapp vier Tassen täglich bzw. 160 Liter pro Kopf und Jahr. Damit ist Kaffee vor Bier Deutschlands beliebtestes Getränk.

Dem Kaffeehandel kommt somit eine große marktwirtschaftliche Bedeutung zu. Allein durch die Kaffeesteuer mit 4,30 DM/kg Röstkaffee und 9,35 DM/kg Kaffee-Extrakt flossen 1999 2,10 Milliarden DM in die Staatskassen. Trotz der zum Jahresende 1999 wieder angestiegenen Rohkaffeenotierungen und eines festen Dollars gaben die Endverbraucherpreise für Röstkaffee im Verlauf von 1999 wettbewerbsbedingt deutlich nach. Im Jahresdurchschnitt unterschritten sie mit 6,97 DM/500g um fast 12 % das Niveau von 1998 (7,89 DM). Entsprechend verringerte sich der Gesamtumsatz der Kaffeeindustrie in Deutschland auf 8,0 Milliarden DM (1998: 8,7 Milliarden DM). Rohkaffee ist dennoch, gemessen an der weltweit umgeschlagenen Menge, nach Erdöl das begehrteste Welthandelsprodukt (Falbe und Regnitz, 1990; Deutscher Kaffee-Verband, 2001).

Röstkaffee stellt in Deutschland mit 90 % die Hauptmenge des konsumierten Kaffees, wobei der Großteil als coffeinhaltiger Kaffee verkauft wird (siehe Abb. 1). Die entkoffeinierten Sorten erreichten 1999 einen Marktanteil von 11 %. Beim löslichen Kaffee, der mit 1,1 Mrd. DM zum Gesamtumsatz der Branche beitrug, war 1999 ein Anstieg auf 13630 Tonnen (entsprechend 35440 Tonnen Rohkaffee) zu verzeichnen. Dies ist in erster Linie auf den zweistelligen Zuwachs bei löslichen Kaffeeprodukten, wie z.B. Cappuccino, zurückzuführen. Insbesondere diese neuen Kaffee-Spezialitäten zeigen seit einigen Jahren große Umsatzsteigerungen: Wurden 1992 noch 5300 Tonnen umgesetzt, waren es 1995 bereits 15200 Tonnen. Bis 1999 steigerte sich der Absatz auf 19150 Tonnen (+16,5 % zum Vorjahr) mit weiter steigender Tendenz. Die Spezialitäten, die nur anteilig aus Kaffee-Extrakt bestehen, sind hier mit ihrem tatsächlichen Gewicht berücksichtigt.

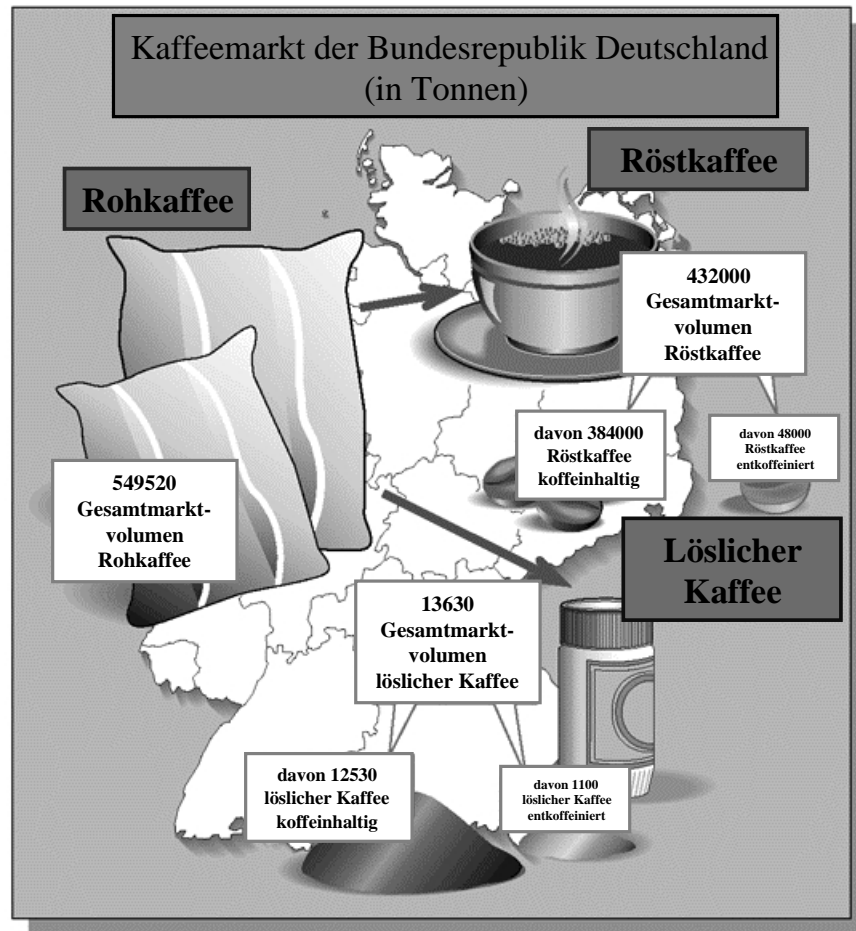


Abb. 1 Kaffeemarkt in Deutschland 1999 (Deutscher Kaffee-Verband, 2001)

1.1.2 Botanik und Anbaubereiche

„Kaffee (Bohnenkaffee) ist der von der Fruchtschale vollständig und von der Samenschale – soweit technisch möglich – befreite Samen von Pflanzen der Gattung *Coffea*.“ (Maier, 1981)

Die Gattung *Coffea* gehört zur Pflanzenfamilie der Rubiaceae (Rötegewächse), zu der nach der botanischen Systematik ca. 500 Gattungen mit über 6.000 Arten zählen. Von wirtschaftlicher Bedeutung sind zwei Kaffeearten. *Coffea Arabica* mit mehr als 70 % der Weltkaffeeproduktion und *Coffea Canephora* var. *Robusta* mit etwa 30 % (Bettencourt und Rodrigues, 1988). Die Pflanze *Coffea Arabica* wächst bis zu 4 Meter Höhe, wird in Kaffeeplantagen durch ständigen Rückschnitt aber strauchartig gehalten. Nach der Befruchtung entwickeln sich in 7-9 Monaten die elliptischen, zwei Samenkerne enthaltenden Steinfrüchte des Kaffeebaums; ihrer Form nach als „Kaffeeirschen“ bezeichnet (Smith, 1985). Ihre Farbe wechselt während der Reifephase von grün über gelb zu rot und im

überreifen Zustand zu schwarz. Aufgrund der langen Blütezeit der Pflanze erstreckt sich die Ernte über mehrere Monate und Kaffeebäume tragen oft Blüten und Früchte gleichzeitig (Maier, 1981)

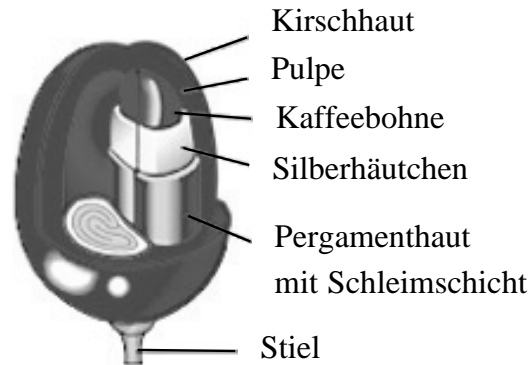


Abb. 2 Querschnitt durch eine Kaffeekeirsche (Deutscher Kaffeeverband, 2001)

Die reife Frucht hat eine rote oder gelbe Haut, die ein weiches, weißgelbliches, zuckerhaltiges Fruchtfleisch (die Pulpe) umschließt. In ihr sind im allgemeinen zwei Samen enthalten, die „Kaffeebohnen“. Jeder Samen wird von einer dünnen, fest anhaftenden Schale geschützt, dem Silberhäutchen. Die Bohnen sind von einer locker aufsitzenden, dünnen und blassgelben Hülle, der Pergamenthaut, umgeben (Smith, 1985) und liefern ein kräftiges Nährgewebe für den dünnen gekrümmten Keimling, der am unteren Ende des Samens sitzt.

Alle *Coffea*-Arten haben ihren Ursprung in Afrika. Die am längsten bekannte wildwachsende Art ist der *Arabica*-Kaffee. Sein natürliches Verbreitungsgebiet liegt im südwestlichen Hochland Äthiopiens sowie im angrenzenden Boma Plateau im Sudan, wo er als Unterwuchs in kühlen schattigen Wäldern in Höhenlagen zwischen 1.300-1.800 m über NN gedeiht. Als Kulturpflanze ist Kaffee verhältnismäßig jung und damit nur wenige Generationen von seinen wildwachsenden Vorfahren entfernt. Der erste systematische Kaffee-Anbau der Sorte *Arabica* wurde im 15. Jahrhundert in Terrassengärten im Südjemen betrieben (Maier, 1981). Mitte des 17. Jahrhunderts wurde die Monopolstellung der Araber beim Kaffee-Anbau durchbrochen und der *Arabica*-Kaffee verbreitete sich über Ceylon, Java und Südamerika weltweit. Heute wird Kaffee in der gesamten Subtropenzone, sowie in tropischen Höhenlagen kultiviert, fast überall zwischen dem 23. Grad nördlicher und 25. Grad südlicher Breite in Amerika, Afrika, Asien und Ozeanien. Die mengenmäßig wichtigsten *Arabica*-Produzenten sind Brasilien, Kolumbien, Mexiko und die Staaten Zentralamerikas (Marshall, 1983). Da *Robusta* kälteempfindlicher als *Arabica* ist, beschränkt sich sein Anbau auf Gebiete zwischen dem

10. Breitengrad nördlich und südlich des Äquators, wobei die Kulturen oft im Flachland angelegt sind. In Ländern wie Indonesien, Brasilien, Elfenbeinküste und Uganda werden die größten Robusta-Mengen produziert.

Weltweit wird auf ca. 10 Millionen Hektar von ca. 15 Milliarden Bäumen Kaffee geerntet. Die Anbauflächen sind auf 70-80 Länder verteilt, von denen 50 Länder in wirtschaftlich nennenswerten Größenordnungen produzieren. Die bedeutendsten Anbauflächen liegen in Südamerika mit 4,8 Millionen Hektar, in Afrika mit 3,8 Millionen Hektar, in Nord- und Zentralamerika mit 1,5 Millionen Hektar und in Asien mit 1,2 Millionen Hektar. Die Welt-Kaffee-Produktion beträgt zwischen 85-100 Millionen Sack à 60 kg jährlich (Smith, 1985; Deutscher Kaffeeverband, 2001).

1.1.3 Ernte und Aufbereitung

Kaffeepflanzen bringen nach 3 bis 4 Jahren die ersten Erträge und nach 6 bis 8 Jahren erreichen die Bäume ihr maximales Produktionsvermögen (Smith, 1985). Überschreiten sie die Altersgrenze von 20 Jahren, gehen die produzierten Mengen allmählich wieder zurück. Normalerweise gibt es eine Kaffee-Ernte pro Jahr. In tropischen Regionen, die sich nicht durch einen klaren Unterschied zwischen Trocken- und Regenzeit auszeichnen, kann es zu zwei Blüten im Jahr kommen, einer Haupt- und einer Nebenernte. Für den besten Kaffee werden nur die reifen Kirschen einzeln mit der Hand gepflückt. Das garantiert ein hohes Qualitätsniveau, ist aber zeit- und arbeitsaufwendig. Speziell für den naß aufbereiteten Arabica-Kaffee wird diese Erntemethode angewandt. Beim Ernten durch „Strip-Pflückung“ werden dagegen alle Kirschen in einem Vorgang von den Zweigen gestreift, unabhängig vom unterschiedlichen Reifegrad der Früchte. Die Früchte fallen dann in auf dem Boden ausgebreitete Tücher. Diese Art zu ernten wird in erster Linie für Robustas sowie brasilianische und äthiopische Arabicas eingesetzt, die für die trockene Aufbereitung bestimmt sind. Die ungleichmäßige Zusammensetzung des Erntegutes aus unreifen, reifen und überreifen Kirschen wirkt sich negativ auf die Qualität des Endproduktes aus, kann aber durch nachträgliche Sortierung ausgeglichen werden.

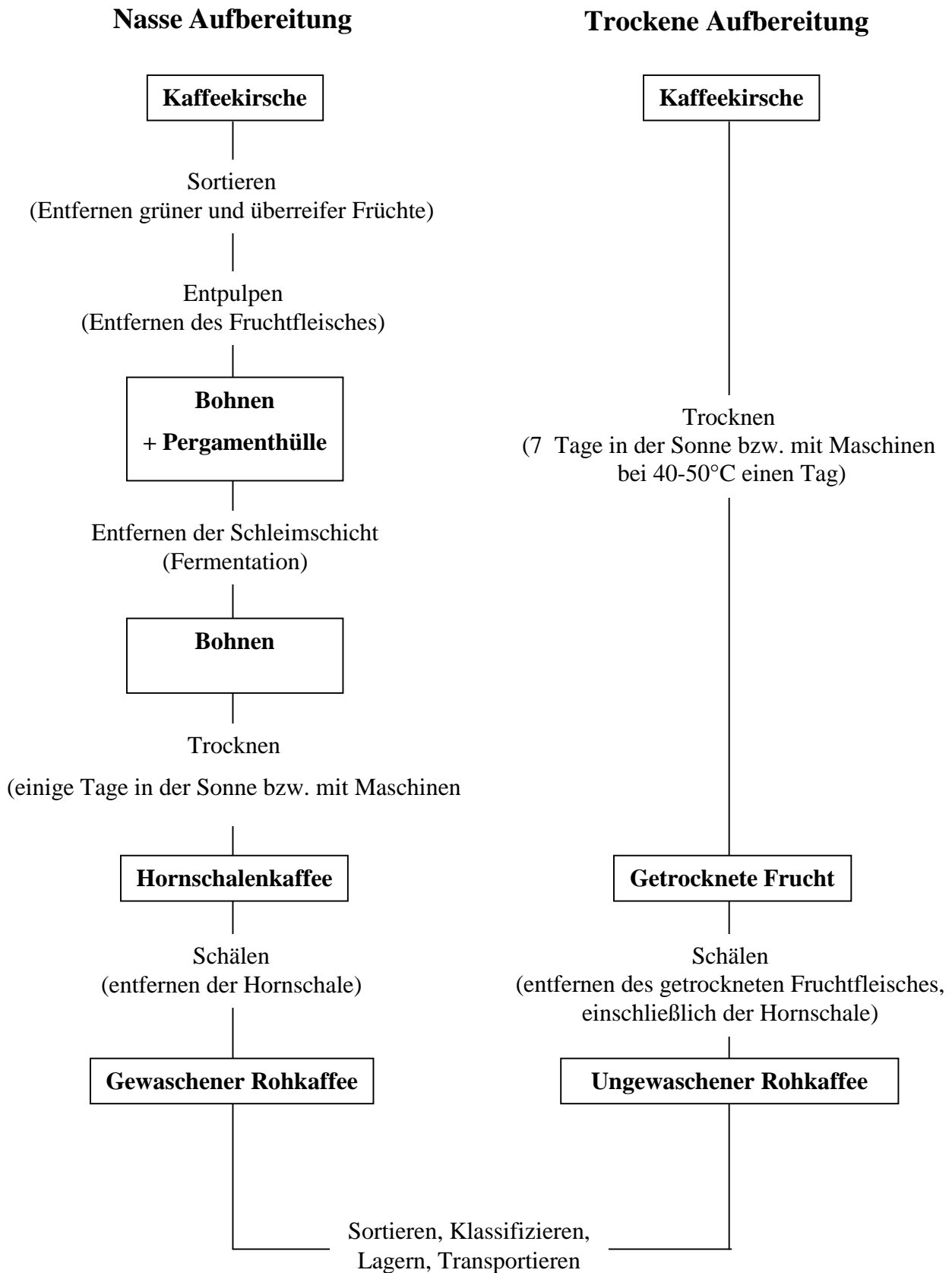


Abb. 3 Aufarbeitungsschema für die nasse und trockene Rohkaffee-Aufbereitung (Maier, 1981)

Die frisch geernteten Kaffeeirschen sind nur eine äußerst kurze Zeit lagerfähig und müssen schnellstmöglich der weiteren Verarbeitung zugeführt werden. Fruchthaut, Fruchtfleisch und Fruchtschleim, Pergamenthaut und möglichst auch die Silberhäutchen und der größte Teil des Wassers in der Bohne werden entfernt, sodaß am Schluß die saubere und trockene Kaffeebohne übrig bleibt. Zwei Verfahren finden hier Anwendung: die trockene und die nasse Aufbereitung (Smith, 1985); schematisch in Abb. 3 verdeutlicht. Bei der trockenen Aufbereitung werden die ganzen Kaffeeirschen so lange getrocknet, bis sich die Bohnen trocken und ohne Rückstände herausschälen lassen. Das Verfahren findet besonders in warmen und trockenen Anbauregionen Verwendung bzw. in Regionen, in denen nicht genügend Wasser für die nasse Aufbereitung vorhanden ist. Robusta-Kaffee wird mit wenigen Ausnahmen trocken aufbereitet; in Brasilien und Äthiopien auch Arabica-Kaffee. Die reifen Kaffeeirschen werden zum Trocknen gleichmäßig auf betonierte oder gepflasterte Trockenflächen ausgebreitet. Nach der Trocknung auf etwa 12 % Restfeuchte werden die Früchte entweder bis zur Weiterverarbeitung in Säcken gelagert oder sofort geschält.

Für die nasse Aufbereitung ist das Vorhandensein von ausreichend Wasser die notwendige Voraussetzung, denn für ein Kilogramm marktfertigen Rohkaffee benötigt man 130 bis 150 Liter. Nach einer Vorsortierung werden die Kirschen durch den Pulper geschickt. Hier wird das Fruchtfleisch so von den Bohnen abgequetscht, daß diese unbeschädigt in ihrer noch von einer Schleimschicht umgebenen Pergamenthauthülle zurückbleiben. Der entpulpte Kaffee wird im Schwemmkanal und durch Siebung weiter selektiert und gelangt in das Fermentationsbecken oder die Fermentationsbehälter. Dort wird der an der Pergamenthaut haftende Restschleim in einem Gärungsprozeß, dem Fermentationsvorgang, gelöst und abwaschbar gemacht. Die Enzyme des Kaffees bewirken diese Fermentation, die 12 bis 36 Stunden dauert. Absolute Sauberkeit aller Anlagen ist notwendig. Eine Bohne, die zu lange der Gärung ausgesetzt war, ist überfermentiert. Diese „Stinkerbohnen“ verderben durch ihr markantes Off-Flavor ganze Kaffeepartien. Der so erhaltene Pergamentkaffee wird auf Trockenplätzen oder Trockenhorden in 10 bis 15 Tagen auf ca. 12 % Feuchtigkeit heruntergetrocknet (Maier, 1981).

Sowohl der trocken aufbereitete Kirschkaffee als auch der sich aus der nassen Aufbereitung ergebende Pergamentkaffee müssen weiter verarbeitet werden. Beim trocken aufbereiteten Kaffee werden in einem Arbeitsgang Fruchtfleisch, Pergamenthülle und soweit möglich die Silberhäutchen entfernt. Vom gewaschenen Kaffee müssen Pergamenthülle und Silberhäutchen getrennt werden. Es werden Schälmaschinen verwendet, in denen das Schälgut entweder gegen einen Widerstand geschleudert oder durch Druck aufgebrochen

wird. Bis der Kaffee vermarktet wird, sind noch zahlreiche Reinigungs- und Sortierarbeiten vorzunehmen. Die Kaffeebohnen werden nach Größe, Dichte und Farbe sortiert und abschließend von Hand, mit mechanischen oder elektronischen Sortiermaschinen klassifiziert.

1.1.4 Röstverfahren

Durch die Röstung erfährt der Kaffee die charakteristischen chemischen und physikalischen Veränderungen, die ihn zu dem uns bekannten Produkt werden lassen. Die Röstung wird bei Temperaturen über 200°C durchgeführt, wobei in jüngerer Zeit der Trend zu höheren Rösttemperaturen und niedrigeren Röstzeiten geht. Die Röstzeit liegt im Bereich von 2-5 Minuten. Wird bei niedrigerer Temperatur geröstet, dauert die Röstung entsprechend länger. Physikalisch kann die Röstung in eine endotherme und eine folgende exotherme Phase unterteilt werden (Baltes, 1977). Durch die einwirkende Hitze und die in der exothermen Phase einsetzenden Reaktionen kommt es zum Verlust von Wasser und organischer Substanz in den Bohnen. Dieser Röstverlust (RV), oder Einbrand, ist ein quantitatives Maß für den während des Röstprozesses auftretenden Massenverlust. Unter Berücksichtigung des Wassergehalts des Rohkaffees kann daraus der organische Röstverlust (ORV) berechnet werden. Dieser wird neben der Röstfarbe oft als Kennwert für die Intensität des Röstprozesses herangezogen.

Die Kaffeeröstung kann im diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Betrieb erfolgen, wobei die Röstgase meist energiesparend rezirkulieren. Als Heizmittel dienen Gas, Heizöl oder in seltenen Fällen elektrischer Strom. Die Röstwärme wird durch Kontakt („Bratpfannenprinzip“) oder Konvektion (Heißluft) auf das Röstgut übertragen, wobei das Konvektionsverfahren in zunehmendem Maße zum Einsatz kommt. Hierbei ist die Wärmeübertragung auf das Röstgut verbessert, was eine Verkürzung der Röstzeit und homogenere Röstung ohne nachteilige Beeinträchtigung der Produktqualität ermöglicht. Die gängigen Röstverfahren sind Chargenröstung, als Trommel- oder Fließbettröster, und kontinuierliche Röstung, bei welcher der Transport und die Röstung des Kaffees in rotierenden Trommeln mit einem innenliegenden Transportsystem erfolgen (siehe Abb. 4).

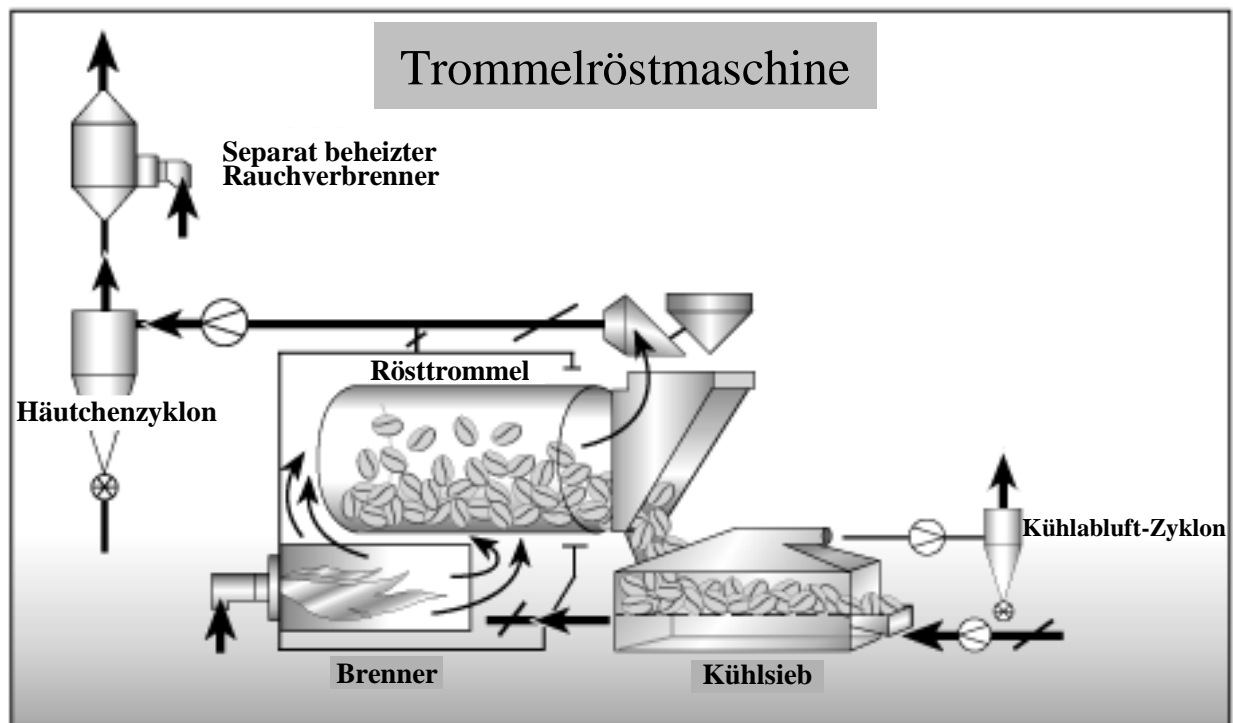


Abb. 4 Prinzip einer Trommelröstmaschine (Deutscher Kaffee-Verband, 2001)

Nach Ablauf des Röstprozesses wird das Röstgut mit Luft oder Wasser gekühlt, wodurch der Röstprozeß schlagartig beendet wird. Eventuell erfolgt eine erneute Entsteinung des Röstkaffees, danach das Verwiegen zur Einbrandkontrolle. Ferner wird der Kaffee, soweit die Qualität des Endproduktes es erfordert, nochmals sortiert und dann in ganzen Bohnen oder als Mahlkaffee verpackt. Bei der üblichen Verwendung von Vakuumverpackungen ist eine Lagerung bis zu 18 Monaten ohne besondere Vorkehrungen möglich.

1.2 Inhaltsstoffe des Kaffees

1.2.1 Übersicht über die Zusammensetzung von grünem und geröstetem Kaffee

Die Rohkaffeezusammensetzung variiert in Abhängigkeit von Sorte, Herkunft, verwendeter Aufbereitungstechnik, sowie den während der Reifung herrschenden klimatischen Bedingungen. Diese Faktoren beeinflussen nicht die im Kaffee vorhandenen Bestandteile, wohl aber ihre Gehalte. Bei der allgemeinen Angabe von Rohkaffeezusammensetzungen wie in Abb. 5 ist daher immer eine gewisse Streubreite der Werte zu berücksichtigen, die aber

nicht für alle Kaffeebestandteile gilt. So sind die Proteingehalte der einzelnen Kaffees mit ca. 10 % nahezu identisch (Macrae, 1985). Hingegen unterscheiden sich die beiden dominierenden Kaffee-Varietäten *Coffea Arabica* und *Coffea Canephora* var. *Robusta* signifikant in ihren Coffein-Gehalten. In Robusta Kaffees finden sich Gehalte von 1,6-2,4 %, während Arabicas nur 0,9-1,2 % Coffein enthalten (Maier, 1981). Weiterhin zeigen sich zwischen *Coffea Arabica* und *Coffea Canephora* var. *Robusta* Unterschiede in den Gehalten an Chlorogensäuren und Lipiden (Clarke und Macrae, 1985), Polysacchariden (Maier, 1989), sowie den Steroiden Kahweol und Cafestol (Speer und Mischnick, 1989).

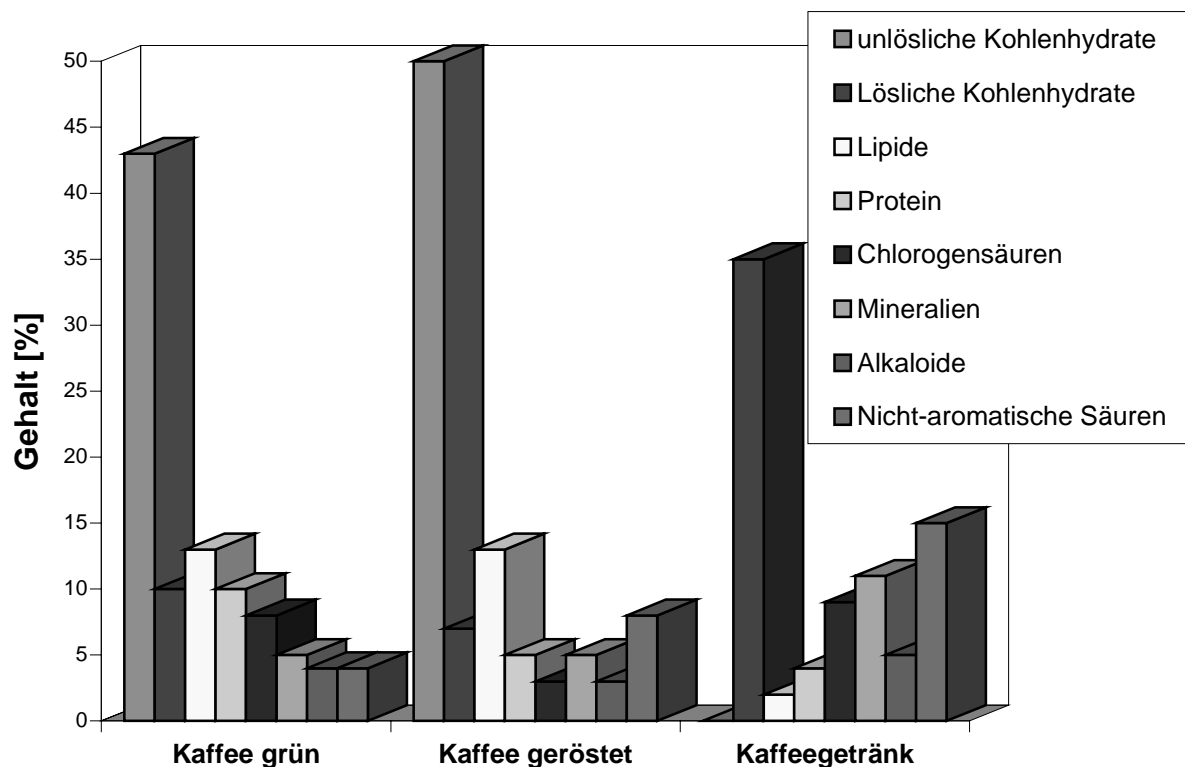


Abb. 5 Allgemeine Übersicht über die Kaffeezusammensetzung nach Maier (1987)

Durch den Röstprozeß kommt es infolge der einsetzenden Maillard-Reaktion, aber auch einer Vielzahl anderer chemischer Umwandlungen wie Dehydrierung, Strecker-Abbau, Pyrolyse, etc. zur Bildung einer Vielzahl an nieder- wie hochmolekularen Röstprodukten. Insbesondere die reaktiven Rohkaffee-Bestandteile wie freie Aminosäuren und Mono- und Disaccharide reagieren im Zuge der Maillard-Reaktion schnell zu einer Vielzahl an Röstprodukten. Übersichten über die Veränderungen während des Röstprozesses bzw. die allgemeine chemische Zusammensetzung des Kaffees finden sich z.B. bei Baltes (1977), Clarke und Macrae (1985) oder Maier (1993).

1.2.2 Sensorisch relevante Inhaltsstoffe

Für die Qualität des Kaffees besonders relevant sind die während der Röstung gebildeten Aroma- und Geschmacksstoffe.

1.2.2.1 Aromastoffe

Der Gesamtgehalt an flüchtigen Aromastoffen im Röstkaffee wird auf etwa 1g/kg geschätzt, womit Kaffee zu den aromareichsten Lebensmitteln zählt (Maier, 1981). Reichstein und Staudinger (1955) isolierten ein gelbes Öl aus Röstkaffee und identifizierten hieraus 70 Verbindungen. Bis heute wurden in einer Vielzahl von Arbeiten über 800 Aromastoffe im Kaffee identifiziert; nahezu alle diese Verbindungen entstehen während der Kaffeeröstung (Kawakami et al., 1995; Grosch, 1996). Es ist davon auszugehen, daß ihre Zahl noch steigt (Shibamoto, 1991). Entsprechend der Komplexität des Rohkaffees und der großen Reaktionsvielfalt, die infolge des Röstprozesses eintritt, sind die gebildeten Aromastoffe ausgesprochen heterogen (Maier, 1989; Dart und Nursten, 1985; Silwar und Lüllmann, 1993). Es dominieren heterocyclische Verbindungen, wobei Furane mit 38-45 % überwiegen, gefolgt von Pyrazinen (25-30 %), Pyridinen (3-7 %) und Pyrrolen. Für viele Aromastoffe sind Bildungsmechanismen erarbeitet und beschrieben (Dart und Nursten, 1985).

Nicht alle diese Verbindungen tragen zum sensorisch wahrnehmbaren Aroma des Röstkaffees bei. Lange wurde nach einer „character impact compound“, also einem Aromastoff gesucht, der das typische Kaffee Aroma erklären kann (Blank et al., 1991; Silwar et al., 1987). Tressl (1989) vermutete, daß 2-Furfurylthiol mit seiner röstigen Note einen Hauptanteil des Kaffee Aromas ausmacht. In späteren Arbeiten wurde dies bestätigt, allerdings kann das Kaffee Aroma nicht allein über das 2-Furfurylthiol erklärt werden. Vielmehr scheint eine kleine Zahl von Aromastoffen („key aroma compounds“) in Kombination für das typische Kaffee Aroma verantwortlich zu sein (Blank et al., 1992; Holscher, 1991; Holscher et al., 1991). Blank et al. (1992) sehen eine Kombination von 13 Aromastoffen als entscheidend für das typische Arabica Aroma an. Grosch führt das Kaffee Aroma auf eine Gruppe von nur 10 Aromastoffen zurück und erreicht durch Kombination von 20-24 Aromastoffen ein dem Kaffee zumindest ähnliches Aroma (Grosch, 1996). Die wichtigsten Aromastoffe sind in Abb. 6 zusammengefaßt. Czerny et al. (1999) stellen anhand von Modelluntersuchungen fest, daß sich das Aroma eines Columbia-Kaffees mit 28 Komponenten simulieren läßt und bestätigen die Einschätzung von Tressl (1989), daß 2-Furfurylthiol die wichtigste

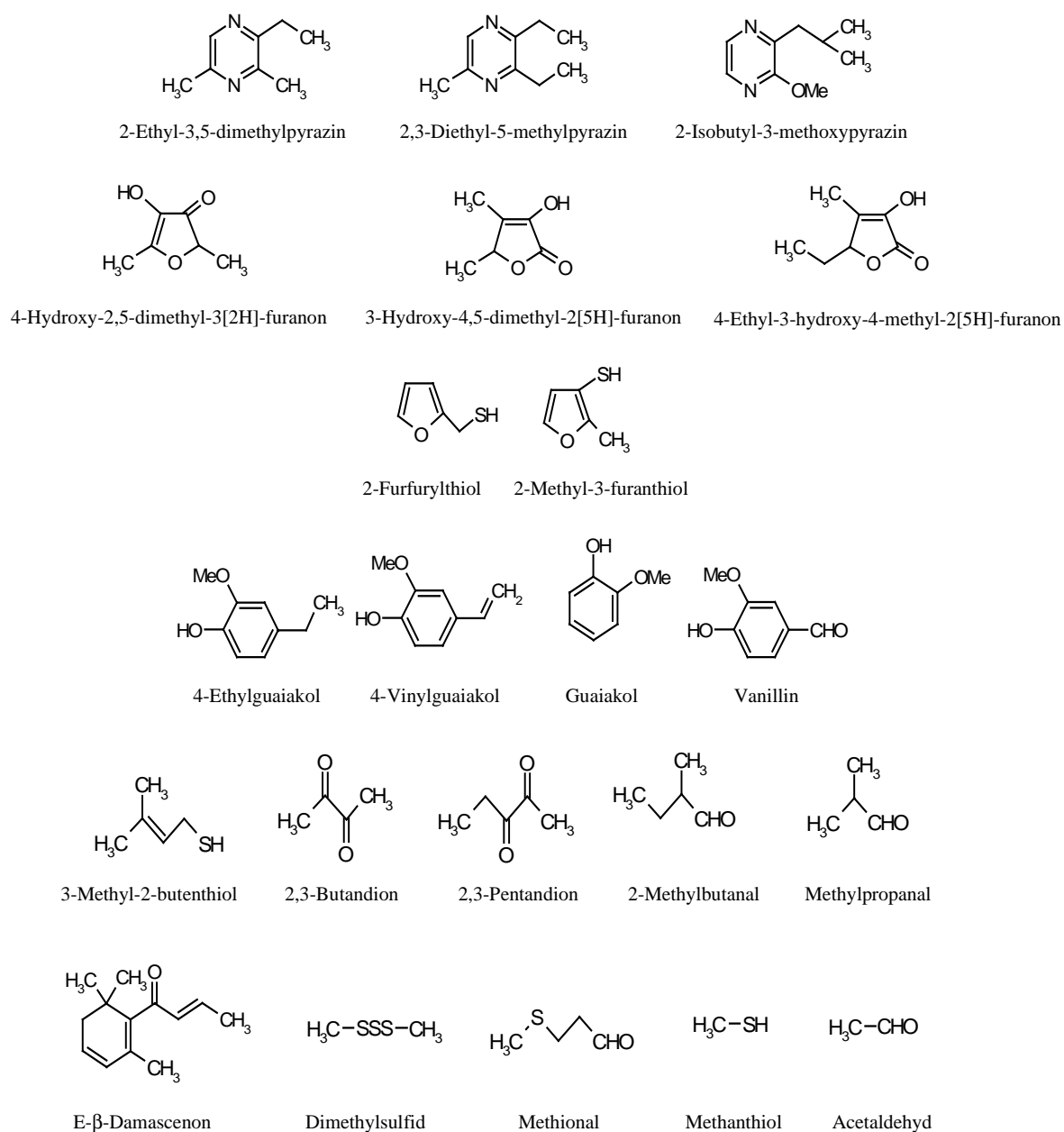


Abb. 6 Strukturen wichtiger Aromastoffe des Kaffees (Grosch, 1996)

Aromakomponente darstellt. Ein großer Unterschied besteht zwischen dem Aroma des Röstkaffees und dem des daraus resultierenden Kaffeegetränks. In Kaffeegetränken aus Arabica- und Robusta-Bohnen wurden 22 relevante Aromakomponenten nachgewiesen (Blank et al., 1992; Semmelroch und Grosch, 1995 und 1996), aber lediglich sechs dieser Verbindungen zählen zu den aromarelevanten Verbindungen des Kaffeepulvers selbst.

Die einzelnen Kaffee-Varietäten unterscheiden sich signifikant in ihren Aromaprofilen, was die Kaffee-Industrie durch Mischungen zum Erreichen des gewünschten Aromas nutzt. Diese Unterschiede sind auf die variierende Zusammensetzung der einzelnen Kaffees zurückzuführen (Biggers et al., 1969; Dart und Nursten, 1985). So finden sich in Robusta höhere Gehalte an phenolischen Aromastoffen, hervorgerufen durch seine im Vergleich zum Arabica höheren Chlorogensäuregehalte, insbesondere an Feruloyl-Chinasäuren, den Prekursoren für Guaiacol, 4-Ethyl-, 4-Methyl- und 4-Vinylguaiacol (Pypker und Brouwer, 1969). Wichtig ist auch das 2-Methylisoborneol (Vitzthum et al., 1990), das mit seinem erdig-würzigen Aroma charakteristisch für Robusta Kaffees ist. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Arabica Kaffees sich über die Aromanoten „karamell-ähnlich“ und „süßlich-röstig“ beschreiben lassen, während in Robustas eher die „würzigen“ und „erdig-röstigen“ Aromanoten überwiegen. Blank et al. (1991) sprechen hier insbesondere den bereits genannten Guaiacolen und den „würzig“ riechenden Pyrazinen eine große Rolle zu.

1.2.2.2 Geschmacksstoffe

Über die geschmackgebenden Substanzen des Röstkaffees ist weit weniger bekannt als über die Aromastoffe, was nicht zuletzt auf die aufwendige Isolierung der Substanzen aus der Kaffee-Matrix zurückgeführt werden kann. Die dem Röstkaffee in erster Linie zugesprochenen Geschmacksattribute sind: bitter, sauer, phenolisch-medizinisch, karamellartig und adstringierend (Feldman et al., 1969). Je nach Mischung bzw. Provenienz in unterschiedlicher Intensität und Reihenfolge.

Die Säure ist im Röstkaffee ein wichtiges Qualitätsmerkmal und trägt mit dem Aroma und der Bitterkeit entscheidend zur Akzeptanz oder Ablehnung einer Kaffeekomposition bei. Arabica-Provenienzen sind reich an Säure, während Robustas geringere Säuregehalte aufweisen. Dieser Unterschied wird beim Vergleich der pH-Werte deutlich. Während der Aufguß von geröstetem Arabica einen pH-Bereich von 4,85-5,15 aufweist, liegt der des Robustas mit 5,25-5,40 bei vergleichbarer Röstung signifikant höher (Vitzthum, 1976). Dies resultiert aus den höheren Gehalten an den pH-Wert bestimmenden Säuren Essigsäure, Ameisensäure, Glykolsäure und Milchsäure in Arabica-Kaffees (Weers et al., 1995). Diese Säuren sind typische Röstsäuren und werden während der Röstung aus Kohlenhydrat-Prekursoren gebildet (Ginz et al., 2000); da Arabicas höhere Gehalte an Saccharose und auch an Fructose und Glucose enthalten, ist ihr höherer Säureanteil leicht verständlich. Zu unterscheiden ist zwischen Azidität und Säure (saurer Geschmack) eines Kaffees. Die Azidität wird primär von

den bereits genannten aliphatischen Säuren bestimmt. Der saure Geschmack indes wird nach Maier (1999) von zwölf Säuren hervorgerufen, unter denen Essigsäure und Citronensäure mit einem Anteil von über 50 % dominieren, gefolgt von Chlorogensäuren (8 %), Ameisensäure (7 %) usw.

Im Gegensatz zu den Säuren sind die Bitterstoffe des Kaffees weiterhin unbekannt. Lediglich Coffein ist als Bitterstoff identifiziert, und trägt nach verschiedenen Untersuchungen nachweislich zur sensorisch wahrnehmbaren Bitterkeit bei. Näheres siehe unter 1.3.3 Bitterstoffe im Kaffee.

1.3 Bitterkeit

Neben Salzig, Sauer und Süß ist Bitter die vierte der Grundgeschmacksarten. Während Sauer und Salzig klar definiert sind und durch eine überschaubare Zahl an Verbindungen hervorgerufen werden, werden die Geschmackseindrücke Süß und Bitter durch eine Vielzahl verschiedener Substanzen ausgelöst. Insbesondere beim bitteren Geschmack zeigt sich in Bezug auf Struktur und Molekülgröße eine große Vielfalt (Rouseff, 1990) und zusätzlich eine große Streuung der sensorischen Sensitivität. Während einige Menschen nahezu keine Empfindlichkeit gegenüber Bitterkeit zeigen, reagieren andere ausgesprochen empfindlich auf diesen Geschmackseindruck (Rouseff, 1990). Da einige natürlich vorkommende Gifte bitter schmecken, geht man davon aus, daß die allgemeine Abneigung gegen bitteren Geschmack als Schutzfunktion für potentiell toxische Substanzen in der Nahrung zu verstehen ist (Brieskorn, 1992). Dieser Schutzmechanismus spielt in unserer heutigen Gesellschaft keine Rolle mehr und somit überleben auch Menschen ohne niedrige Bitterkeits-Erkennungsschwelle, was die große Streuung in der Empfindlichkeit gegenüber bitterem Geschmack erklären könnte.

Für die meisten Produkte wird Bitterkeit als sensorischer Defekt, als Off-Flavor, und nicht als Qualitätskriterium verstanden. Es besteht daher ein großes Interesse, die Bitterkeit hervorrufenden Substanzen zu bestimmen und Wege zu finden, ihre Entstehung während der Herstellung des Produkts zu steuern, zu verhindern oder durch gezielte Zugabe anderer Stoffe die Bitterkeit zu maskieren.

1.3.1 Struktur von Bitterstoffen

Bitterkeit wird von aliphatischen wie aromatischen Verbindungen ausgelöst, von geradkettigen wie polycyclischen, von Glycosiden wie ihren Aglyconen mit nahezu jeder denkbaren funktionellen Gruppe (Rouseff, 1990). Kleine strukturelle Modifikationen z.B. eine D- anstelle einer L-Aminosäure, lassen eine geschmacksneutrale Verbindung bitter schmecken. Dies erschwert wesentlich die Möglichkeit über die chemische Struktur einer Substanz vorauszusagen, ob sie bitter ist oder nicht. Weiterhin kommt hinzu, daß zwischen dem süßen und dem bitteren Geschmack ein direkter Zusammenhang zu bestehen scheint. Einige Süßstoffe, wie Saccharin, schmecken zusätzlich bitter, und bittere Flavanonglycoside zeigen durch kleinste Strukturänderung intensiven Süßgeschmack. In Tab. 1 ist zur Verdeutlichung der großen Bandbreite von Bitterstoffen eine generelle Übersicht über verschiedene Bitterstoffe gegeben.

Tab. 1 Übersicht über Bitterstoffe (van der Heijden, 1985a, b)

Substanzklasse	Vertreter
Phenole	Pikrinsäure, Phenylphenol
Hydroxy-Fettsäuren	9,10,13- und 9,12,13-Trihydroxy-10-Octadecensäure
Aminosäuren	L-Norleucin
Amine	Dodecylamin
Flavanonglykoside	Naringin
Ester & Lactone	2,4,6-Trihydroxyoctylbenzoat
Peptide	Phe-Phe-Gly
Alkaloide	Coffein
N-Heterocyclen	Diketopiperazine
Kronenether	Dibenzo-18-Crown-6
Thiocarbonyle	5-Phenyltrithion
Amide, Lactame	Denatoniumchlorid
Triterpene	Lucidinsäure
Zucker-Derivate	Saccharose-Oktaacetat
Weitere sekundäre Pflanzenstoffe	Amarogentin, Artabsin, Humulone

Grob lassen sich Lebensmittel und ihre Bitterstoffe in zwei große Gruppen untergliedern: a) Lebensmittel, die bereits im rohen, unverarbeiteten Zustand bitter schmecken und b) nichtbittere Lebensmittel, die durch die Verarbeitung (z.B. thermische oder enzymatische Behandlung) bitteren Geschmack entwickeln.

1.3.1.1 Natürlich vorkommende Bitterstoffe

Zu den bekanntesten Bitterstoffen zählen Coffein und Chinin. Beide werden in der Sensorik wegen ihres reinen Bittergeschmacks als Referenzsubstanzen für Bitterkeit verwendet. Coffein, mit einer Bitterkeits-Erkennungsschwelle zwischen 0,045-0,125 mg/L (Macrae, 1985) findet sich als Produkt des sekundären Pflanzenstoffwechsels in pflanzlichen Lebensmitteln wie Tee und Kaffee. Chinin, das Hauptalkaloid der Chinarinde, wird als Bitterstoff in Tonic Water eingesetzt.

Früchte wie Äpfel, Zitronen, Oliven, verschiedene Beeren usw. enthalten Bitterstoffe. Hierbei handelt es sich primär um bitter schmeckende phenolische Verbindungen des sekundären Pflanzenstoffwechsels. In Äpfeln werden Procyanidine (polymerisierte Flavan-3-ole) als bitter schmeckende Substanzen angesehen. Eine Procyanidin-Abnahme in Äpfeln geht einher mit verminderter Bitterkeit (Rouseff, 1990). In Grapefruits, bei denen Bitterkeit eine gewünschte Aromaeigenschaft darstellt, sind Flavanon-Neohesperidosine, vor allem Naringin, für die Bitterkeit verantwortlich (Rouseff, 1990). Verbreiteter als in Früchten sind Bitterstoffe in Gemüsearten wie Kartoffeln, Bohnen, Erbsen, Zucchini (Telek et al., 1974; Guha und Sen, 1975). Hier variieren die Stoffklassen deutlich und einige Bitterstoffe sind zudem toxisch, wie die cyanogenen Glycoside von Lima Bohnen. Detailliertere Übersichten über Bitterstoffe in Früchten und Gemüse finden sich bei Rouseff (1990) oder Belitz und Wieser (1985).

Milchprodukte, wie Käse und Joghurt, die unter Einwirkungen von Mikroorganismen hergestellt werden, entfalten oftmals unerwünschte Bitternoten. Diese sind auf durch enzymatischen Abbau von Proteinen freigesetzte Peptide und Aminosäuren zurückzuführen. Durch die enzymatische Hydrolyse werden die in der Protein-Tertiärstruktur innenliegenden hydrophoben Aminosäuren-Seitenketten freigesetzt und der Wechselwirkung mit den Rezeptoren der Geschmackszellen zugänglich gemacht (Pedersen, 1994). Peptide und Aminosäuren stellen die am besten untersuchten Bittersubstanzen dar (Adler-Nissen, 1986; Tanimoto et al., 1992; Ishibashi et al., 1987-1988; Belitz et al., 1981). Sie eignen sich zu Studien über Bitterkeit und die sie wahrnehmenden Rezeptoren, da Aminosäuren sowohl süßen wie bitteren Geschmack hervorrufen (Näheres siehe unter 1.3.2).

1.3.1.2 Bitterstoffe in erhitzten Lebensmitteln

In thermisch behandelten Lebensmitteln ist das Auftreten von Bitterkeit stark verbreitet. Die Kenntnisse über Bitterkeit auslösende Stoffe und ihrer Prekursoren aber ist weit weniger fortgeschritten. Dies ist auf die Komplexizität der bei der Herstellung von Lebensmitteln ablaufenden Reaktionen zurückzuführen. Durch die Maillard-Reaktion, den Strecker-Abbau, Dehydrierungen, Polymerisation usw. entstehen eine Vielzahl an nieder- wie hochmolekularen Stoffen. Da die Reaktionsabläufe nicht grundsätzlich verstanden sind, richtet sich die Bitterstoff-Forschung in diesem Bereich vor allem auf Modellversuche von Kohlenhydraten mit Aminosäuren oder Proteinen. Dennoch, bei einigen behandelten Lebensmitteln ist die auftretende Bitterkeit erforscht und die zugrundeliegenden Substanzen sind identifiziert.

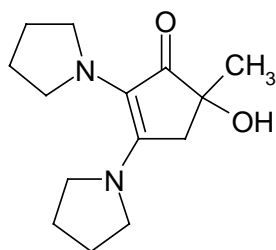
Bei erhitzten Avocados ist das Auftreten eines bitteren Off-Flavors bekannt (Bates, 1970; Ben-et et al., 1973) und gilt als der limitierende Faktor für die Verwendung von Avocados in erhitzten Lebensmitteln. Die auftretende Bitterkeit des erhitzten Avocado-Fleisches kann auf die Anwesenheit von drei Acetylen-Komponenten, also thermisch generierten Lipid-Abbauprodukten, zurückgeführt werden. Die Verbindungen sind in kleinen Mengen bereits in roher Avocado enthalten, durch thermische Belastung nehmen ihre Gehalte dann stark zu.

Bei Kakao identifizierten Pickenhagen et al. (1975) cyclische Dipeptide, sogenannte Diketopiperazine (DKPs). Durch sensorische Versuche stellten sie fest, daß insbesondere diejenigen DKPs, die aus hydrophoben Aminosäuren wie Prolin und Phenylalanin aufgebaut sind, stark bitter schmecken. Weiterhin konnten sie zeigen, daß die Isomerie der chiralen C-Atome der die DKPs aufbauenden Aminosäuren keinen Einfluß auf die Bitterkeit der Substanz hat, da alle verkosteten Isomerengemische die gleiche Bitterkeits-Erkennungsschwelle zeigten. Ferner stellten die Autoren einen Synergismus zwischen dem Hauptalkaloid Theobromin und den identifizierten DKPs fest. Dieses Zusammenspiel kann die markante Bitterkeit des Kakaos erklären. Die Diketopiperazine sind im rohen Kakao nicht enthalten, sondern entstehen erst während der Aufbereitung der Frucht. Neben Kakao wurden sie in geröstetem Malz, das für die Produktion von dunklem Bier Verwendung findet, identifiziert (Sakamura et al., 1978). Für die DKPs wurden Gehalte zwischen 0,0006-0,13 % gefunden, während die Bitterkeits-Schwellen mit 0,05-0,1 % angegeben werden. Die Autoren gehen daher davon aus, daß die Substanzen für die Bitterkeit des Malzes keine wesentliche Rolle spielen, schließen aber auch hier eine synergistische Wirkung mit anderen Inhaltsstoffen nicht aus. Weiterhin konnten bittere Diketopiperazine in Essig, Bier, Sojasoße

und Sherry nachgewiesen werden (Takahashi et al., 1974). Bis auf diese und einige weitere Ausnahmen basiert die Kenntnis von thermisch generierten Bitterstoffen weitgehend auf Modellexperimenten. Diese bringen im Vergleich zu Lebensmitteln den Vorteil einer überschaubaren Zahl an Reaktionspartnern und eingeschränkter Komplexität des Reaktionsgemisches. Während in erhitzten Lebensmitteln mehr als 10000 Reaktionsprodukte zu erwarten sind, beschränkt sich in Modellreaktionen die Anzahl auf ca. 1000. Dennoch sind die meisten der in Modellröstungen entstehenden Bitterstoffe bisher unbekannt. Durch Modellröstungen verschiedener pflanzlicher wie tierischer Proteine konnten Jugel et al. (1976) zeigen, daß Proteine generell als Prekursoren von Bitterstoffen anzusehen sind. Die Aminosäurezusammensetzung scheint hier lediglich auf die Intensität der Bitterkeit einen Einfluß zu haben. Im Gegensatz zu erhitzten Proteinen konnte bei der Erhitzung einer Reihe von Polysacchariden wie Cellulose, Stärke etc. keine sensorisch wahrnehmbare Bitterkeit im wäßrigen Extrakt festgestellt werden (Jugel et al., 1976).

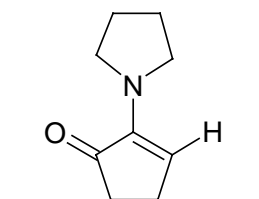
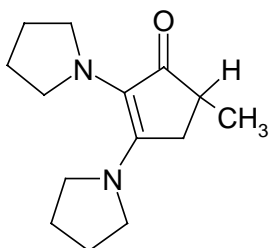
Neben der Bildung einer Vielzahl an Aromastoffen wird die Maillard-Reaktion als entscheidender Bildungsweg für thermisch induzierte Bitterstoffe angesehen (Maga, 1990). Die meisten der bisher aus Maillard-Reaktionsansätzen isolierten Verbindungen sind heterocyclischer Natur. Pyrazine, Pyrrole, Furane, Thiophene, Thiazole, Thiazoline, Thiazolidine und Imidazole sind typische Verbindungen solcher Reaktionsansätze (Shibamoto, 1983). Eine Vielzahl dieser Verbindungen ist bisher nicht auf ihre Bitterstoff-Eigenschaften hin untersucht worden. Dennoch läßt sich aus den bisherigen Ergebnissen ableiten, daß bei der Anwesenheit von Prolin in Modellreaktionen nahezu immer Bitterstoffe gebildet werden (Shigematsu et al., 1975; Maga, 1990). So identifizierten Pabst et al. (1984) in Modellröstungen von Prolin mit Saccharose verschiedene Dipyrrolidinoxosereductone (siehe Abb. 7). Die Bitterkeitsschwellen der Verbindungen liegen bei 0,03 bis 0,2 mmol/L. Die Autoren gehen von einer Reaktion der aus der Saccharose nach Hydrolyse zu Glucose und Fructose über Aminkatalyse gebildeten Desoxyoxone mit dem decarboxylierten Prolin aus. Über Dehydrierungen und andere Reaktionswege bilden sich so eine Vielzahl an möglichen Substanzen, darunter auch die bitteren Dipyrrolidinoxosereductone (Pabst et al., 1984).

Hofmann (1998) konnte eines dieser Pyrrolidinoxosereductone und ein Bispyrrolidinoxosereducton in Modellröstungen von Glucose mit Prolin nachweisen, schlägt aber einen alternativen Bildungsmechanismus über Acetylformoin als Intermediat vor. Bisher konnten solche Verbindungen nur in Modellsystemen gefunden werden. Für stark thermisch



7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepin-8(1H)-on

2,3-Bis-(1-pyrrolidinyl)-5-hydroxy-5-methyl-2-cyclopenten-1-on



2-(1-Pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on

2,3-Bis-(1-pyrrolidinyl)-5-methyl-2-cyclopenten-1-on

Abb. 7 Bittere Maillard-Produkte aus Prolin/Kohlenhydrat-Modellröstungen
(Pabst et al., 1984; Tressl et al., 1985)

belastete Lebensmittel, wie Kaffee, kann davon ausgegangen werden, daß die Reductone zu instabil sind, um die hohen Temperaturen des Röstprozesses zu überdauern.

Tressl et al. (1985) identifizierten bittere 2-(1-Pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-one und Cyclopenten(b)azepin-8(1H)-one in Modellröstungen von Prolin/Monosacchariden und Prolin/cyclischen Enolon-Mischungen (siehe Abb. 7). 7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent(b)azepin-8(1H)-on wurde in geröstetem Malz und Bier identifiziert. Tressl konnte weiterhin zeigen, daß die Bildung der bitteren 2-(1-Pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-one sowie der Azepine direkt an die Anwesenheit von Prolin gebunden ist. Beide Klassen von Substanzen entstehen über Strecker-Abbau von Prolin mit cyclischen 1,2-Diketonen bzw. Enolonen, die während der Maillard-Reaktion über Aldolkondensation aus Komponenten wie Glykoaldehyd und Pyruvaldehyd gebildet werden. Bei Ersatz von Prolin gegen Hydroxyprolin hingegen treten keine Bitterstoffe mehr auf (Tressl et al., 1985). Eine Übersicht über die Vielzahl an bitteren Substanzen bei der Reaktion von Prolin mit Kohlenhydraten gibt Maga (1990).

1.3.2 Modellvorstellung des Bitterstoffrezeptors und der generellen Wahrnehmung von bitterem und süßem Geschmack

Der menschliche Geschmackssinn ist in der Lage, die vier Grundgeschmacksarten Süß, Salzig, Sauer und Bitter zu unterscheiden. Die Wahrnehmung erfolgt auf der Zunge, aber auch im Gaumen und Rachenraum. Dabei ist die Empfindlichkeit der Zunge gegenüber den vier Grundgeschmacksarten nicht in allen Bereichen gleich intensiv, vielmehr treten bevorzugte Regionen hervor; für den bitteren Geschmack ist dies der hintere Zungengrund, für den süßen die Zungenspitze (Brieskorn, 1992). In den anderen Zungenbereichen ist die Wahrnehmung dieser beiden Geschmackseindrücke ebenfalls möglich, jedoch mit geringerer Sensitivität. Die Wahrnehmungsorgane für die Geschmackseindrücke auf der Zunge sind die Geschmackspapillen, die inhomogen über die ganze Zunge verteilt sind. Der Mensch besitzt zwischen 10-12 Arten von Papillen, wobei die einzelnen Arten auf verschiedene

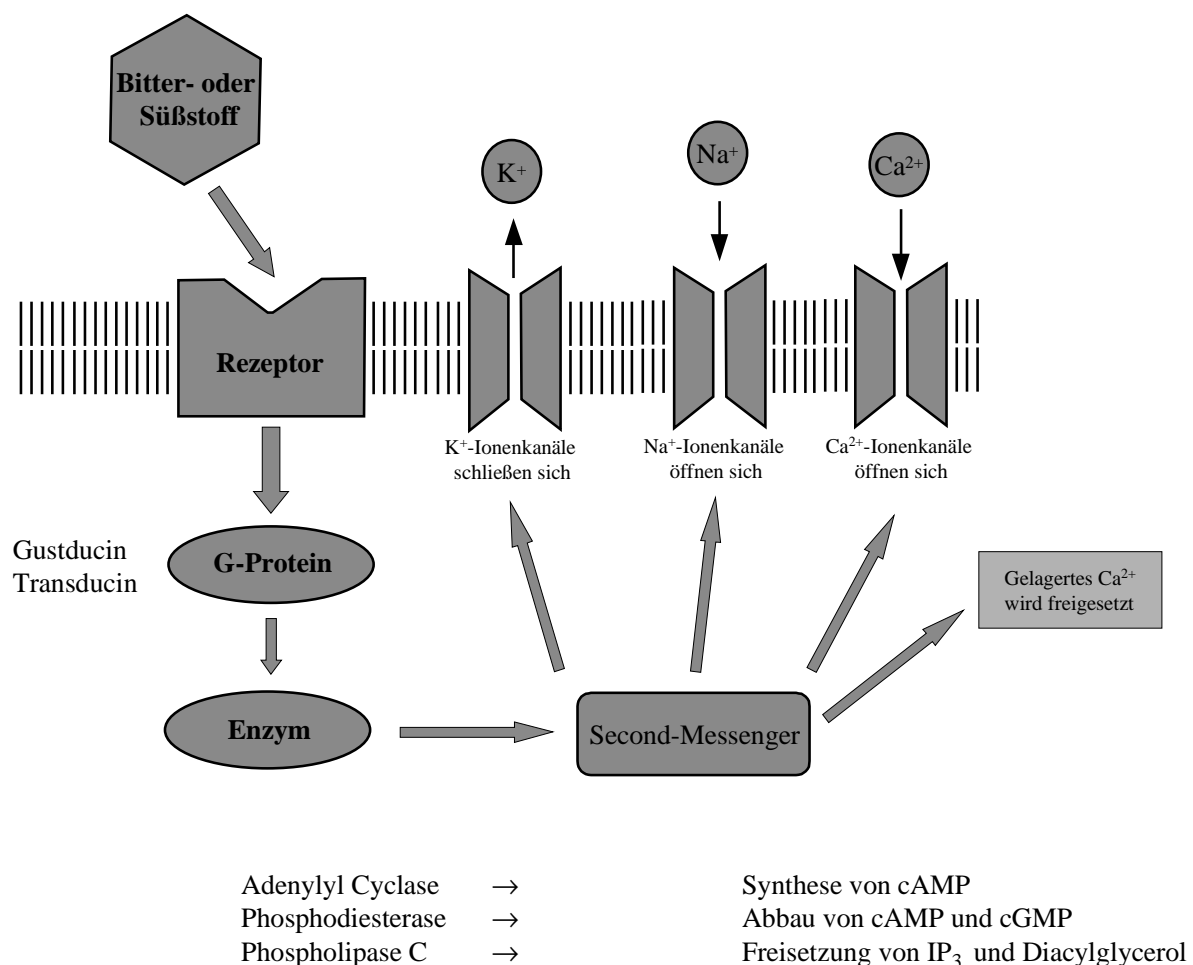


Abb. 8 Schematische Übersicht über Zellreaktionen bei Kontakt mit süßen und bitteren Substanzen (Walters, 1996)

Geschmacksstoffe unterschiedlich intensiv ansprechen. Die sogenannten Circumvallat-Papillen sind die größten Papillen. Sie befinden sich bevorzugt in der hinteren Zungenregion und sind primär für die Bitterkeits-Wahrnehmung verantwortlich. In die Oberfläche der Geschmackspapillen sind die Geschmacksknospen eingebettet, wobei verschiedene Papillen aus unterschiedlich vielen Geschmacksknospen bestehen. Circumvallat-Papillen enthalten Hunderte von Geschmacksknospen; sie tragen damit den Großteil zur Gesamtmenge der menschlichen Geschmacksknospen bei. Jede dieser Geschmacksknospen besteht aus 5-18 Geschmacks-Rezeptorzellen; zusammen mit den Basal- und Begleitzellen sind es zwischen 40-60 Zellen, die eine Geschmacksknospe bilden (Brieskorn, 1992).

Bis heute ist es nicht gelungen, die Rezeptoren für süßen bzw. bitteren Geschmack zu isolieren. Dennoch sind über die Wahrnehmung von bitterem wie süßem Geschmack eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt worden, die eine theoretische Vorstellung der in der Geschmackszelle ablaufenden Reaktionen bei Kontakt mit süßen und bitteren Geschmacksstoffen geben. Es zeigen sich verschiedene Wege der Wechselwirkung von Süß- und Bitterstoffen mit den Geschmackszellen. Dazu zählen extrazelluläre Wege über Ionenkanäle und Rezeptoren an der Zellmembran der Geschmackszellen, aber auch intrazelluläre Wege über „membran-gängige“ Substanzen. Sowohl süßer als auch bitterer Geschmack scheinen nach den bisherigen Erkenntnissen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptors = GPCR) abzulaufen. G-Proteine sind intrazelluläre Proteine, die Second-Messenger, wie cAMP oder cGMP aktivieren können. Diese GPCR gehören zu einer großen Familie von Rezeptoren, die die Antworten auf eine Vielzahl an chemischen Signalen wie Neurotransmission übertragen (Walters, 1996) (siehe Abb. 8). Es sind Transmembran-Proteine, die ein Signal außerhalb der Zelle aufnehmen und durch Konformationsänderung die Aktion eines GTP-bindenden-Proteins (G-Protein) innerhalb der Zelle auslösen. Dieses G-Protein kann nun durch Dissoziation in Untereinheiten einen oder mehrere Second- oder Third-messenger, wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), cyclisches Guaninmonophosphat (cGMP) usw. auslösen. Die dissoziierende α -Einheit aktiviert das Enzym, welches dann den Second-Messenger aktiviert. Die β -/ γ -Untereinheit haben ebenfalls physiologische Funktion in der Zelle, die aber noch nicht voll verstanden ist (Brand, 1997). Ein Anstieg der Konzentration dieser Second-Messenger führt je nach Art des Messengers zum Öffnen bzw. Schließen bestimmter Ionenkanäle, wodurch ein Nervenimpuls ausgelöst wird. Im Ruhezustand zeigt das Cytoplasma der Zelle ein negatives Potential von -60 mV (Stryer, 1991), die intrazelluläre Kalium-Ionenkonzentration ist hoch, die Natrium- und Calcium-Ionenkonzentration hingegen niedrig. Öffnen sich die Natrium- oder Calcium-

Ionenkanäle, ausgelöst durch erhöhte Konzentration an Second-Messengern, so strömen positiv geladene Ionen in die Zelle und ihr Potential ändert sich; ein Nervensignal wird ausgelöst. Gleiches erfolgt, wenn die Kalium-Ionenkanäle sich schließen; Kalium-Ionen akkumulieren in der Zelle und erhöhen das negative Potential. Weiterhin können Second-Messenger intrazellulär gespeicherte Ca^{2+} -Ionen freisetzen. Durch die steigende Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Zelle wird dann ein Nervenimpuls ausgelöst.

Es sprechen einige Tatsachen dafür, daß GPCRs bei der Übertragung dieser Geschmackseindrücke eine wichtige Rolle spielen. So erhöht Saccharose die Aktivität des Enzyms Adenylyl-Cyclase in Geschmacks-Nervenmembranen. Dieses Enzym produziert den Second-Messenger cAMP (Striem et al., 1989). Neben Saccharose erhöhen auch die meisten getesteten Süßstoffe die cAMP-Gehalte in Geschmackszellen. Schiffmann et al. (1995) konnten zeigen, daß viele Substanzen, die G-Protein-Adenylyl Cyclase Systeme aktivieren, gleichzeitig geschmacksaktiv sind. Weiterhin identifizierten McLaughlin et al. (1992) ein für Geschmackszellen charakteristisches G-Protein. Dieses als Gustducin bezeichnete Protein ähnelt sehr dem G-Protein Transducin der Retina. Transducin aktiviert das cyclische Nukleotid PDE (Phosphodiesterase), welches die Hydrolyse von cyclischen Nukleotiden wie cGMP katalysiert und so deren Gehalte in der Zelle herabsetzt und zum Schließen von z.B. cGMP-abhängigen Calcium-Kanälen führt. Man geht davon aus, daß Gustducin auf dieselbe Weise wirkt. Wong et al. (1996) konnten zeigen, daß Mäuse, bei denen das Gustducin-Gen deaktiviert ist, nahezu zu keiner Wahrnehmung von Bitter- und Süßstoffen in der Lage sind. Wie zu erwarten wurden aber weder die Wahrnehmung von salzigem noch von saurem Geschmack beeinflusst. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß Gustducin eine große Rolle in der Wahrnehmung sowohl von süßem als auch bitterem Geschmack spielt. Price (1973) konnte zeigen, daß Bitterstoffe das Enzym Phosphodiesterase in Geschmackszellen aktivieren, welches über Transducin und Gustducin in Geschmackszellen aktiviert wird (Ruiz-Avila et al., 1995). So bewirkt der Bitterstoff Denatoniumchlorid einen Anstieg der Calcium-Ionenkonzentration in den Geschmackszellen (Akabas et al., 1988). Die Substanz bewirkt eine Aktivierung der Enzyme Gustducin und Transducin in den Geschmackszellen, die dann über PDE den Anstieg der Calcium-Ionenkonzentration bewirken. Auch Saccharose und hochwirksame Süßstoffe führen zu erhöhten Calcium-Konzentrationen in Geschmackszellen, was einen ähnlichen Mechanismus wie für Denatoniumchlorid vermuten läßt (Bernhardt et al., 1996). Ferner wurde ein weiterer Second-Messenger, das Pyrophospho-Inositid (IP_3) mit dem interzellulären Anstieg an Calcium-Ionen in Geschmackszellen verknüpft (Hwang et al., 1990). Einige Süßstoffe scheinen über dieses IP_3 zu wirken, welches

intrazellulär gespeichertes Calcium freisetzt, während Saccharose die Calcium-Ionenkanäle öffnet und so extrazelluläres Calcium in die Zelle strömt.

Daß bitterer und süßer Geschmack in direktem Zusammenhang stehen, zeigt sich ferner durch einige weitere Beobachtungen: Bei Mischungen von süßen mit bitteren Stoffen kann eine eindeutige Abnahme beider Geschmackseindrücke festgestellt werden (Lawless, 1982). Verkostet man Saccharose-Lösungen, so weist danach verkostetes Wasser einen intensiven Bittergeschmack auf (McBurney und Bartoshuk, 1973). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß einige Substanzen, wie Chinin, Saccharin oder Neohesperidin den Rezeptor umgehen und direkt die G-Proteine aktivieren (Naim et al., 1994). Dieses Phänomen könnte die bekannten synergistischen Effekte einiger Süß- und Bitterstoffe erklären. Wenn Substanzen auf verschiedenen Wegen einen Geschmackseindruck erzeugen können, ist eine mehr als additive Zellantwort durchaus denkbar, da mehr G-Proteine aktiviert werden, als nur über einen der beiden Wege (DuBois et al., 1993). Einen weiteren Hinweis auf Bitterstoff-Wechselwirkung auf verschiedenen Wegen liefert die Arbeit von Warmke und Belitz (1993). Durch Zugabe von Glutaminsäure zu Lösungen von L-Valin und anderen Aminosäuren wurde deren Bittergeschmack signifikant reduziert, während die Bitterkeit von z.B. Naringin nicht beeinflußt wurde.

Da es bis heute noch nicht gelungen ist, die Rezeptoren selber zu isolieren und zu charakterisieren, basieren alle Struktur-Vorstellungen der Rezeptoren auf der Analyse von Süß- und Bitterstoffen. Shallenberger und Acree (1967) und Shallenberger (1996) erarbeiteten anhand von Untersuchungen an Aminosäuren ein Modell für den Aufbau des Süßstoff-Rezeptors bzw. für die chemischen Voraussetzungen, die eine Substanz erfüllen muß, um einen süßen Geschmackseindruck zu entfalten. Das Konzept wurde von Kier (1972) durch eine hydrophobe Bindungsstelle der Substanz an den Rezeptor zum AH-B-Modell nach Shallenberger, Acree, Kier ergänzt. Dieses Konzept kann das Auftreten von süßem Geschmack für eine Vielzahl an Verbindungen erklären. Van der Heijden et al. (1985a, b) gehen näher auf die dreidimensionale Struktur der dritten Bindungsstelle gegenüber der AH-B-Bindungsstelle ein und testen ihre Annahmen an verschiedenen homologen Reihen von Süßstoffen. Die Tatsache, daß kleine Unterschiede in der Struktur einer Substanz einen Süßstoff in einen Bitterstoff „verwandeln“ bzw. umgekehrt (Walters, 1996), führt zu Studien von Belitz et al. (1981) mit dem Ziel, ein ähnliches wie das Shallenberger-Acree-Kier-Modell für Süßstoffe auch für Bitterstoffe zu entwickeln. Anhand intensiver sensorischer Studien mit Aminosäuren, Peptiden und anderen Substanzen wurde ein sogenanntes N_s/E_s-Modell für Süß- und Bitterstoffe entwickelt. Belitz et al. (1981) versuchen damit der Tatsache Rechnung

zu tragen, daß bei Aminosäuren je nach Isomerie beide Geschmackseindrücke wahrgenommen werden. Nach ihrem Modell ist nicht, wie von Shallenberger, Acree und Kier angenommen, ein Kontakt über Wasserstoff-Brücken zwischen Rezeptor und Substrat nötig, sondern alle Substanzen mit einem nukleophilen N_s - und einem elektrophilen E_s -Zentrum führen bei Kontakt mit dem Rezeptor zu einer süßen Geschmackswahrnehmung. Die Autoren gehen ferner in Anlehnung an Kier (1972) von einer größeren, relativ unrestrictiven hydrophoben Tasche im Rezeptor aus, die neben den beiden nukleophilen und elektrophilen Zentren vorhanden ist. Je nach Stellung und Anwesenheit von nukleophilen und/oder elektrophilen Zentren bzw. hydrophoben Resten entfaltet eine Substanz süßen, bitteren oder süß/bitteren Geschmack nach folgenden allgemeinen Regeln (siehe auch Abb. 9):

- Um süßen Geschmack zu entwickeln, muß eine Substanz ein nukleophiles und ein elektrophiles Zentrum beinhalten. Eine hydrophobe Seitenkette ist für diesen Geschmack entbehrlich, entscheidend aber für seine Qualität und Quantität.
- Für bitteren Geschmack hingegen sind polare wie unpolare Gruppen erforderlich. Allerdings ist eine polare Gruppe ausreichend unabhängig davon, ob diese nukleophil oder elektrophil wirkt. Auch die Anwesenheit beider polarer Gruppen ist möglich, wenn auch nicht nötig.

Somit bestimmen Art, Anzahl und auch Position der polaren Gruppen den Geschmack einer Verbindung. Weiterhin sind die Ladungsverteilung in einem Molekül und besonders Größe und Position der unpolaren Gruppen entscheidend. Belitz et al. (1981) gehen davon aus, daß die hydrophobe Tasche eine große Flexibilität für Wechselwirkungen zeigt. Da Bitterstoffe im Gegensatz zu Süßstoffen nur eine polare Gruppe benötigen, um mit dem Rezeptor in Wechselwirkung zu treten, entfalten sie eine wesentlich größere strukturelle Vielfalt. Für einige der bekannten Geschmacksstoffe, wie Aminosäuren, Peptide, Amine usw. kann dieses Konzept das Auftreten von süßem bzw. bitterem Geschmack erklären, bei anderen Substanzklassen allerdings nicht. Dies ist z.T. darauf zurückzuführen, daß die Autoren zum Auslösen einer Zellantwort ausschließlich den Kontakt einer Substanz mit der Geschmackszelle über ein Trans-Membran-Rezeptorprotein berücksichtigen. Bitterstoffe können aber wie schon erwähnt auch direkt, ohne einen Rezeptor, auf die Zelle wirken. Diese Art von Kommunikation kann das Modell nicht abdecken und Bitterstoffe, die auf diesem Weg wirken, dementsprechend nicht erfassen.

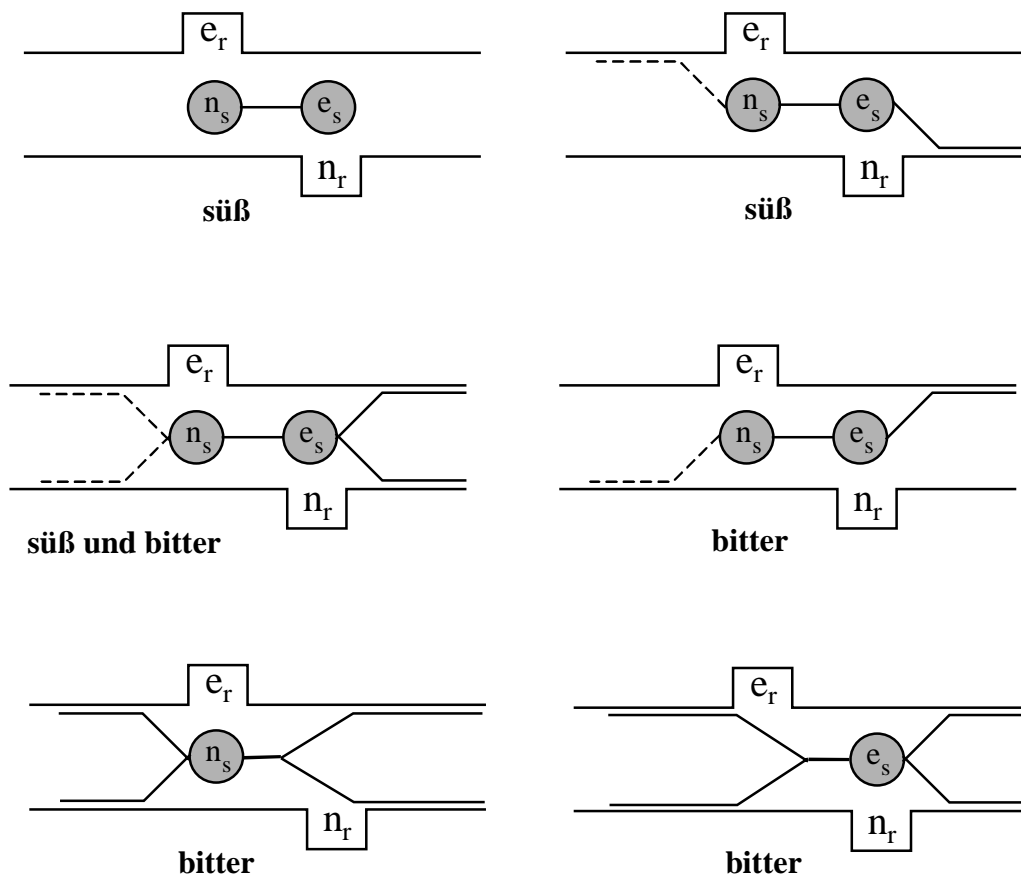


Abb. 9 Modellvorstellung des Süß-Bitter-Rezeptors (Belitz et al., 1981)

Neben diesem strukturell angelegten Konzept entwickelte Ney (1979) eine generelle Regel zur Voraussage, ob Peptide und Proteine bitteren Geschmack entfalten oder nicht. Basierend auf dem Anteil an hydrophoben Aminosäuren und den daraus resultierenden hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander, berechnet er die Bitterkeit von Peptiden und Proteinen über die sogenannte Q-Regel. Enthalten Peptide und Proteine einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren, so schmecken sie bitter. Die Regel basiert auf der Annahme, daß die freie Energie ΔF des Überganges von der Helixform eines Proteins zum „Knäuel“ sich aus der Summe der freien Energien ΔF der das Protein aufbauenden Aminosäuren zusammensetzt. Die Summe dieser Energien, dividiert durch die Anzahl an Aminosäuren, gibt einen sogenannten Q-Wert. Ist dieser Wert größer als 1350 schmecken die Peptide und Proteine bitter. Sind die Q-Werte kleiner entfalten sie keinen bitteren Geschmack. Überschreitet das Molekulargewicht die Grenze von 6000 Da, so erlischt der bittere Geschmack wieder.

1.3.3 Bitterstoffe im Kaffee - bisherige Erkenntnisse

Bitterkeit zählt zu den wichtigsten Qualitätsmerkmalen in geröstetem Kaffee und stellt den am häufigsten mit Kaffee assoziierten Geschmackseindruck dar (McCamey et al., 1990). Rohkaffee selbst ist nicht bitter und enthält demzufolge nur wenig freie Bitterstoffe. Während der Röstung nimmt die Bitterkeit in Abhängigkeit vom Röstgrad drastisch zu. Es ist entscheidend bei der Kaffeeröstung, die Entstehung von Bitterstoffen zu kontrollieren. Demzufolge ist es erstaunlich, daß über die Substanzen, die für dieses wichtige Kaffeequalitätskriterium verantwortlich sind, nahezu nichts bekannt ist.

Eine Vielzahl an Kaffee-Inhaltsstoffen ist mit dem bitteren Geschmack des Getränks in Verbindung gebracht worden, z.T. mit widersprüchlichen Ergebnissen. Zu diesen Verbindungen zählen Chinasäure, Furfural, Coffein, Trigonellin, Chlorogensäuren, Kaffeesäure, Carbonsäuren, Aminosäuren, Peptide, Proteine sowie heterocyclische Verbindungen.

Tab. 2 Bitterverdächtige Substanzen im Kaffee (McCamey et al., 1990)

Substanz/ Substanzklasse	Konzentration in geröstetem Kaffee [mg/L]	Schwellenwert [mg/mL]
Chinasäure	3200-8700	10
5-Hydroxymethylfurfural	10-35	200
Furfuryl-Alkohol	300	19-40
Chlorogensäuren	3000-10000	20-27
Citronensäure	1800-8700	96-590
Milchsäure	0-3200	144-400
Essigsäure	900-4000	22-70
2,5-Dimethylpyrazin	17-40	1
Coffein	100000-300000	78-155

Coffein ist der einzige bisher in Kaffee identifizierte Bitterstoff, der nachweislich einen Beitrag zur wahrnehmbaren Bitterkeit des Getränks leistet. Im grünen Kaffee sind je nach Kaffee-Sorte Gehalte zwischen 1,0 und 3,0 % Coffein beschrieben (Macrae, 1985). Dabei liegt es z.T. frei, aber auch in Form von Coffein-Kalium-Chlorogensäure-Komplexen vor (Clifford, 1985). Coffein ist thermisch ausgesprochen stabil und überdauert den Röstprozeß

ohne größere Verluste. Bei einem Bitterkeitsschwellenwert von 60-200 ppm (Belitz, 1975) findet es sich in bis zu 20fach höherer Konzentration im Kaffeegetränk. Verschiedene Autoren haben sich daher mit der Funktion des Coffeins als Bitterstoff im Kaffee befaßt und schreiben ihm einen Anteil von 10-30 % an der wahrnehmbaren Gesamtbitterkeit des Kaffeegetränkes zu (Voilley et al., 1977; Chen, 1979). Insbesondere da entcoffeinierter Kaffee ebenfalls bitter schmeckt und die Intensität nahezu der des „normalen“ Kaffees entspricht, scheint diese Einschätzung nicht abwegig. Abgesehen vom Coffein finden sich keine eindeutig charakterisierten Bitterstoffe im Kaffee, denen ein sensorisch wahrnehmbarer Anteil an der Gesamtbitterkeit zugesprochen wird. 70-90 % der Gesamtbitterkeit des Röstkaffees bleiben damit ungeklärt.

Verschiedene Substanzen werden in diesem Zusammenhang in der Literatur kontrovers diskutiert. Chlorogensäuren werden immer wieder als potentielle Bitterstoffe genannt. Mit Gehalten zwischen 6-11 % an der Trockenmasse des Rohkaffees bilden sie einen wesentlichen Bestandteil (Clifford, 1985). Sensorische Untersuchungen an Reinsubstanzen in wäßrigen Lösungen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt (Maga, 1978; Nagel et al., 1987; Clifford und Ohiokpehai, 1983). Dabei wird den Chlorogensäuren bitterer und adstringierender Geschmack zugesprochen. Chlorogensäuren werden aber während des Röstprozesses zunehmend abgebaut und zeigen somit einen der Bitterkeit des Röstkaffees gegenläufigen Trend, die mit zunehmendem Röstgrad stark ansteigt (Chen, 1979). Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es fraglich, ob die Chlorogensäuren einen Beitrag zur Kaffeebitterkeit leisten. Gleiches kann mit Ausnahme des Coffeins für die anderen bitterverdächtigen Substanzen des Rohkaffees, wie Trigonellin, Citronensäure, Äpfelsäure etc. angenommen werden. Auch die Gehalte dieser Substanzen nehmen mit dem Röstgrad ab, zeigen also ebenfalls eine negative Korrelation zur Kaffeebitterkeit.

Vielversprechender sind in diesem Zusammenhang daher Substanzen, die erst während der Röstung gebildet werden bzw. deren Gehalte signifikant ansteigen. Bereits Belitz (1975) geht davon aus, daß die Röstkaffee-Bitterkeit sich über während der Röstung entstehende Substanzen erklären läßt und spricht den „Rohkaffee-Bitterstoffen“ eine eher untergeordnete Rolle zu. Eine solche Verbindung wäre die Chinasäure. Ihr Gehalt steigt infolge hydrolytischer oder thermischer Spaltung der Chlorogensäuren während der Röstung kontinuierlich an. Zwar reagiert sie ihrerseits weiter, wird aber aus den Chlorogensäuren nachgebildet. Maga (1978) bestimmt ihre Bitterkeits-Erkennungsschwelle auf 10 ppm, womit ihre Gehalte in geröstetem Kaffee mit ca. 200 ppm etwa 20fach höher liegen (Hughes und Thorpe, 1987). McCamey et al. (1990) sprechen der Chinasäure in diesen Konzentrationen

einen bitteren, aspirin-ähnlichen Geschmack zu. Untersuchungen, ob Chinasäure im Kaffeegetränk tatsächlich an der wahrnehmbaren Bitterkeit beteiligt ist, sind bisher nicht erfolgt.

Eine Vielzahl weiterer Untersuchungen beschäftigen sich eher allgemein mit Bitterkeit im Kaffee, ohne auf definierte Substanzen einzugehen. So berichten Maier et al. (1984) über abnehmende „Säure-Wahrnehmung“ in Kaffee-Getränken mit zunehmender Bitterkeit. Liardon et al. (1984) konnten eine Korrelation zwischen Pyridin-Gehalt und wahrnehmbarer Bitterkeit in Kaffeegetränken aufzeigen und nach Shibamoto et al. (1981) korreliert die Bitterkeit von Arabica Columbia mit dem Gehalt an Furfuryl-Alkohol. Spekuliert wird auch über die Rolle von Röst-Melanoidinen in Bezug auf die Kaffee-Bitterkeit. Berücksichtigt man die zunehmende Bitterkeit des Kaffees mit zunehmendem Röstgrad, korreliert die Bildung von Melanoidinen, die ebenfalls mit der Röstung zunehmen, positiv mit der Bitterkeit. Die fortschreitende Maillard-Reaktion zwischen Aminosäuren und Zuckern führt zur verstärkten Bildung von nieder- und vor allem hochmolekularen Melanoidinen. Trotz dieser positiven Korrelation ist es bisher nicht gelungen, zwischen beiden Entwicklungen einen Zusammenhang herzustellen. Vielmehr zeigen sich aus Kaffee isolierte hochmolekulare Melanoidine bei sensorischer Verkostung geschmacklich neutral, was eventuell mit ihrer Molekülgröße erklärt werden kann, die Wechselwirkungen mit den Rezeptoren der Geschmackszellen nicht mehr zuläßt. Da Melanoidine aber hinsichtlich ihrer Molekülgröße und -struktur ausgesprochen heterogen sind, ist eine Beteiligung insbesondere von bisher noch unbekannten, niedermolekularen Melanoidinen an der Kaffeebitterkeit durchaus denkbar.

1.4 Problemstellung

Die Qualität eines Kaffees und damit zugleich seine Akzeptanz beim Verbraucher wird bestimmt durch sein Aroma und seinen Geschmack. Die charakteristischen Geruchseindrücke und die ihnen zugrundeliegenden Aromasubstanzen der einzelnen Kaffee-Varietäten sind weitgehend aufgeklärt und soweit entwickelt, daß die Aroma-Qualität eines Kaffees über die quantitative Bestimmung von etwa 25 Aromaverbindungen, den Key-Aroma-Compounds, bestimmt werden und eine zuverlässige Aussage über den ordnungsgemäßen Röstverlauf in der Produktion gegeben werden kann.

Das Wissen über die Geschmacksstoffe des Kaffees ist weit weniger fortgeschritten. Der Geschmack eines Kaffeegetränks definiert sich im wesentlichen über die Eindrücke: Bitter

und Sauer. Eine Vielzahl an flüchtigen wie nichtflüchtigen Säuren wurde im Kaffee identifiziert, quantifiziert und ihr Einfluß auf den Geschmack des Getränks untersucht. Insbesondere die aliphatischen Säuren, wie Essigsäure, Ameisensäure etc. werden im Zusammenspiel mit Chinasäure und Chlorogensäuren etc. für die Säure des Kaffees verantwortlich gemacht

Die Bitterkeit des Kaffees, welche den am meisten mit Kaffee assoziierten Geschmackseindruck darstellt, ist hingegen kaum erforscht. Weder sind die ihr zugrundeliegenden Substanzen noch Wege zu deren Beeinflussung bekannt. Damit steht der Kaffee-Industrie bis heute keine Möglichkeit zur Verfügung, durch Wahl von Röstbedingungen oder Verwendung einzelner Kaffee-Provenienzen diesen wichtigen Qualitätsparameter im Kaffee zu kontrollieren und zu steuern. Vor dem Hintergrund, daß gerade die Bitterkeit des Kaffees ein entscheidendes Kriterium für die Akzeptanz einer Kaffee-Komposition beim Verbraucher darstellt, ist dieser Kenntnisstand unbefriedigend. Ziel dieser Arbeit ist es daher, einen tieferen Einblick in die Strukturen der Bitterstoffe des Kaffees zu erhalten. Es sollen neue bisher unbekannte Bitterstoffe identifiziert, quantifiziert und wenn möglich ihre Rolle für die Gesamtbitterkeit des Kaffeegetränkes abgeschätzt werden. Da keine genaue Kenntnis über die mögliche Struktur von Kaffeebitterstoffen besteht, soll Kaffee fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen sensorisch auf Bitterkeit verkostet werden. Die interessanten Fraktionen werden weiter fraktioniert und analysiert. Infolge der zu erwartenden Heterogenität der Kaffeebitterstoffe wird LC-MS als Screening-Methode eingesetzt.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Diketopiperazine in geröstetem Kaffee

2.1.1 Isolierung und Röstung von Rohkaffee-Proteinen

Daß Proteine wie die anderen Rohkaffeebestandteile durch die Röstung tiefgreifenden chemischen Veränderungen unterliegen, steht außer Frage. Die Ergebnisse von Jugel et al. (1976) lassen aber zusätzlich vermuten, daß Proteine in erhitzten Lebensmitteln generell als Bitterstoff-Prekursoren anzusehen sind. Die Autoren rösteten verschiedene pflanzliche und tierische Proteine und verkosteten die daraus hergestellten Heißwasserextrakte sensorisch auf Bitterkeit. Bei allen untersuchten Proteinen wurde eine intensive Bitterkeit mit Schwellenwerten im Bereich von 0,00005-0,008 % festgestellt. Diese Schwellenwerte liegen in der Größenordnung von Chininhydrochlorid (0,001 %). Aufgrund der Ergebnisse vermuteten Jugel et al. (1976), daß Proteine generell bedeutende Vorläufer für Röstbitterstoffe darstellen. Dabei scheint ihre Primärstruktur, also die Aminosäurezusammensetzung der Proteine, keinen Einfluß auf das Auftreten der Bitterkeit selber zu haben, sondern lediglich auf die Intensität. Eine Identifizierung der bitteren Substanzen gelang nicht. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist es nicht auszuschließen, daß Kaffeeproteine während des Röstprozesses ebenfalls bittere Abbauprodukte bilden. Bereits Baltes (1977) nimmt an, daß die Kaffeeproteine während der Röstung Bitterstoffe entwickeln. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, werden die wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine aus der Rohkaffee-Matrix isoliert und geröstet.

2.1.1.1 Isolierung wasserlöslicher Rohkaffee-Proteine

Im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer pflanzlicher Lebensmittel wurden die Aminosäuren und insbesondere die Proteine des Kaffees bisher wenig untersucht. Dies ist unter dem Gesichtspunkt, daß Proteine mit 10 % und freie Aminosäuren mit 1-2 % (MacDonald und Macrae, 1985) im Rohkaffee einen nicht unbeträchtlichen Anteil stellen, erstaunlich. Die Rohkaffee-Proteine teilen sich zu je 50 % in eine wasserlösliche Albumin-Fraktion und eine wasserunlösliche Fraktion auf, die sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht grundlegend unterscheiden (Macrae, 1985). Verschiedene meist ältere Arbeiten beschäftigen sich mit den Unterschieden im Proteingehalt bzw. der Aminosäurezusammensetzung von

Coffea Arabica und *Coffea Canephora* var. *Robusta*. Thaler und Gaigl (1963) analysieren die Aminosäureverteilung verschiedener Kaffees nach Totalhydrolyse mit 6 N HCl. Dabei stellen sie weder in den Proteingehalten noch in der Aminosäureverteilung signifikante Unterschiede fest. Die auftretenden Variationen werden nicht als sortenspezifisch gedeutet, sondern auf unterschiedlichen Reifegrad, Lagerung usw. zurückgeführt. Spätere Arbeiten bestätigen diese Einschätzung weitgehend (MacDonald und Macrae, 1985). Amorim und Josephson (1975) analysieren die isolierten wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine verschiedener Arabica Brazil Unterarten auf ihre Proteinzusammensetzung mit Hilfe elektrophoretischer Methoden, wie Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Zwischen den einzelnen Kaffees ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise finden die Autoren bei ihren Untersuchungen über Gelfiltration eine im alkalischen Milieu grünlich gefärbte Fraktion. Eine solche Färbung ist typisch für Chlorogensäuren. Daher gehen Amorim und Josephson (1975) von einer Bindung zwischen Chlorogensäuren und Proteinen bzw. Peptiden im Rohkaffee aus. Ob die Chlorogensäuren über Wasserstoff-Brücken oder kovalent an die Proteine gebunden sind und um welche Art von Chlorogensäuren es sich hier handelt, wird nicht untersucht. Eine Wechselwirkung von Chlorogensäuren und Proteinen ist von anderen pflanzlichen Lebensmitteln z.B. Sonnenblumen bekannt (Sabir et al., 1974) und wird dort sowohl auf Wasserstoff-Brückenbindungen wie auch auf kovalente Bindungen zwischen dem Sauerstoff der Peptidbindung und einer phenolischen OH-Gruppe der Chlorogensäure zurückgeführt. Da im Rohkaffee sowohl Proteine wie auch Chlorogensäuren in großer Menge vorliegen, ist eine solche Wechselwirkung ebenfalls nicht auszuschließen.

Die Isolierung der wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine erfolgt über ein dreistufiges Fraktionierungs-Schema aus der Rohkaffee-Matrix wie in Abb. 10 dargestellt. Bei der Entwicklung dieses Aufarbeitungsschemas standen drei Prämissen im Vordergrund:

- a) Die Proteine sollten durch die Isolierung sowohl chemisch als auch thermisch so gering wie möglich belastet werden.
- b) Es darf keine Technik verwendet werden, die eine geschmackliche Beeinflussung der isolierten Proteine zur Folge hat.
- c) Da die isolierten Proteine geröstet und sensorisch verkostet werden sollen, ist auf die Verwendung toxischer Chemikalien zu verzichten, um die Gesundheit des Sensorik-Panels nicht zu gefährden.

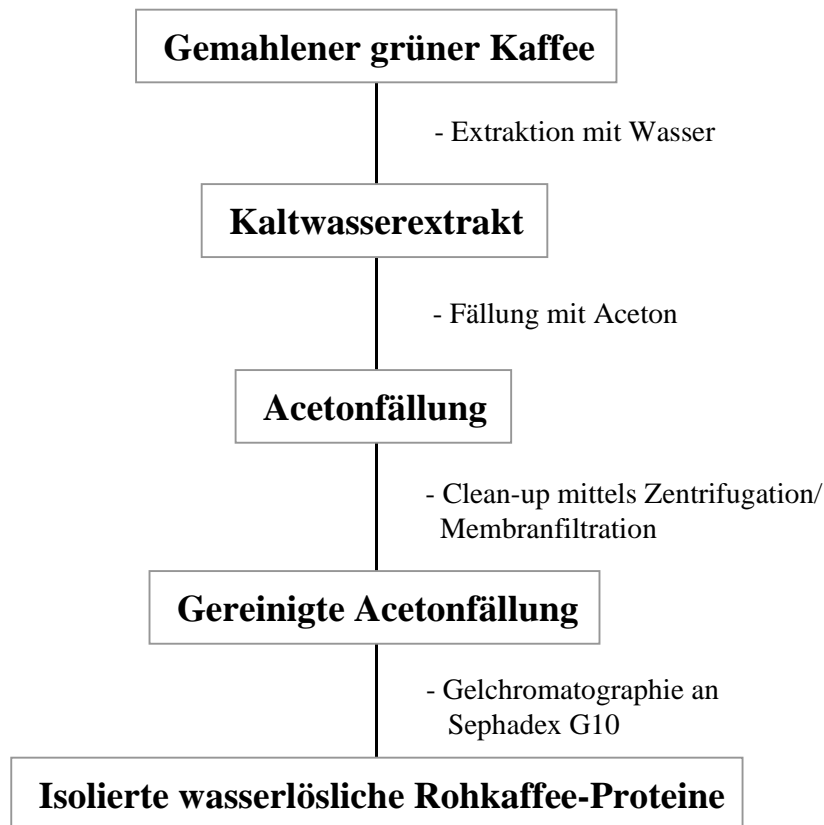


Abb. 10 Schema zur Isolierung der wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine

Als Folge dieser Einschränkungen muß auf eine Vielzahl an in der Protein-Isolierung üblichen Methoden wie der präparativen isoelektrischen Fokussierung verzichtet und auf klassische Methoden zurückgegriffen werden. Amorim und Josephson (1975) verwenden eine Kombination aus Dialyse, Ultrafiltration und Fällung mit Trichloressigsäure zur Isolierung von Proteinen aus Rohkaffee. Diese Vorgehensweise erfordert einen Zeitaufwand von sechs Tagen für die Dialyse. Dadurch wird eine Veränderung der Proteine relativ wahrscheinlich. Arnold (1995) beschreibt Probleme mit der Denaturierung der Kaffee-Proteine bei einer Dialyse von 24 h Dauer. Die von uns gewählte Technik der Fällung mit Aceton birgt wie alle Proteinfällungen mit organischen Lösungsmitteln grundsätzlich die Gefahr der Denaturierung, bringt aber im Vergleich mit Dialysen einen großen Zeitgewinn. Weiterhin ist eine Kontamination der Proben durch Mikroorganismen, die bei einer langen Dialysezeit zu erwarten ist, auszuschließen. Nach einer Reinigung der Acetonfällung mittels Zentrifugation und Membranfiltration (die nötig ist, da ein kleiner Teil der Proteine durch die Fällung denaturiert wird) werden die mitgefällten nichtproteinogenen Bestandteile über Gelchromatographie an Sephadex G10 abgetrennt. Wie schon von Amorim und Josephson

(1975) beobachtet, sind die isolierten Rohkaffee-Proteine im Alkalischen leicht grünlich, und es kann ein Anteil an gebundenen Chlorogensäuren vermutet werden (s.o.). Die Ausbeuten für die vier Fraktionen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. 3 Ausbeuten der einzelnen Fraktionen der Proteinisolierung aus Rohkaffee [%];
a) bezogen auf Rohkaffee, b) bezogen auf die vorherige Fraktion.

Fraktion	Mittlere Ausbeute [%]	
	a	b
Kaltwasserextrakt	24,3	24,3
Acetonfällung	5,6	23,0
Gereinigte Acetonfällung	5,3	95
Rohkaffee-Proteine	4,8	90

Die Fraktionierung läßt sich reproduzierbar durchführen (siehe Anhang I). Geht man von einem Gehalt von ca. 5 % wasserlöslicher Rohkaffee-Proteine im verwendeten Kaffee aus (Macrae, 1985), so läßt sich bei einem Wert von 4,8 % auf eine gute Anreicherung der Proteine über die Aufarbeitung schließen.

2.1.1.1.1 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Kontrolle, ob über die Aufarbeitung tatsächlich eine ausreichende Anreicherung der Rohkaffee-Proteine erfolgt, werden die Proteingehalte in den vier Fraktionen der Aufarbeitung anhand zweier unabhängiger Methoden bestimmt. Da ausschließlich wasserlösliche Proteine bestimmt werden sollen, bieten sich hier photometrische Methoden an. Zur Standard-Analytik von Proteinen zählen die Färbungen mittels Coomassie Brilliantblau nach Bradford (1976) sowie die Biuret-Färbung über Komplexierung von Proteinen mit Kupfersulfat (Darbre, 1986).

Coomassie Brilliantblau G-250 ist ein synthetischer Direktfarbstoff, der Proteine tiefblau verfärbt. Chemisch handelt es sich hier um eine Triarylmethan-Sulfonsäure. Die Substanz liegt somit im Sauren undissoziiert, im Alkalischen als Salz vor. Die undissoziierte Säure ist

rot gefärbt (λ_{\max} 474 nm); das Anion blau (λ_{\max} 598 nm). Der isosbestische Punkt liegt bei 525 nm. Das Farbstoff-Anion bildet mit basischen Gruppierungen eines Proteins aus mäßig saurer Lösung ein blaues licht- und waschechtes Farbsalz. Die Tiefe der Färbung entspricht hier der relativen Zahl an kationischen Gruppen im Protein, die von Protein zu Protein variieren können (Jaenicke, 1997). Da die zu untersuchenden Proteine im allgemeinen nicht zur Verfügung stehen, verwendet man in der Protein-Analytik als Eichstandard Rinderserumalbumin (BSA). Die über die BSA-Eichgerade resultierenden Proteingehalte der vier Fraktionen sind demzufolge lediglich als Richtwert zu verstehen, da nicht davon ausgegangen werden kann, daß die wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine in Bezug auf das Farbreagenz exakt gleich dem BSA reagieren. Die Linearität der Methode wurde im Konzentrationsbereich von 10-100 $\mu\text{g/mL}$ BSA anhand einer Kalibriergeraden überprüft (Korrelation 0,9949). Es werden die Proteingehalte aller vier Fraktionen (Wasserextrakt, Acetonfällung, gereinigte Acetonfällung und Rohkaffee-Proteine) der Proteinisolierung aus Rohkaffee nach dieser Methode bestimmt (siehe Tab. 4; vollständige Daten siehe Anhang II). Die Werte bestätigen die gute Anreicherung der Proteine, wobei die Fällung mit Aceton den entscheidenden Konzentrierungsschritt darstellt.

Der Name der Protein-Bestimmung nach Biuret beruht auf der Farbreaktion mit gelöstem Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat im alkalischen, wäßrigen Milieu (Biuret-Reaktion). Es entsteht ein rotvioletter Farbkomplex zwischen den Cu^{2+} -Ionen und je zwei Biuretmolekülen bzw. Proteinmolekülen. Die Reaktion ist typisch für Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen und kann daher für den kolorimetrischen Nachweis von Peptiden und Proteinen verwendet werden. Das Farbmaximum des gebildeten Komplexes liegt in Abhängigkeit vom jeweilig komplexierten Protein zwischen 540-550 nm (Lottspeich und Zorbas, 1998). Im Vergleich zu anderen Farb-Assays ist der Biuret-Assay der unempfindlichste. Die Kalibrierung erfolgt erneut mittels BSA und ist über 50-500 $\mu\text{g/mL}$ mit einer Korrelation von 0,9999 linear. (vollständige Daten siehe Anhang II). Die Ergebnisse beider Methoden decken sich weitgehend (siehe Tab. 4), wobei die Biuret-Methode marginal höhere Proteingehalte liefert. Da die Kalibrierung mit BSA durchgeführt wurde, sind die Werte von 90 % bzw. 91 % Proteingehalt für die isolierten Rohkaffee-Proteine durchaus realistisch. Insbesondere wenn man ferner die Beobachtung in Betracht zieht, daß die isolierten Proteine im alkalischen grün erscheinen und damit wahrscheinlich gebundene Chlorogensäuren enthalten (siehe 2.1.1.1).

Tab. 4 Proteingehalte der vier Fraktionen der Rohkaffee-Protein Isolierung

	Bradford-Methode (%)	Biuret-Methode (%)
Kaltwasserextrakt	21	23
Acetonfällung	85	87
Gereinigte Acetonfällung	86	88
Wasserlösliche Rohkaffee-Proteine	90	91

2.1.1.1.2 Gelelektrophoretische Analyse

Die Untersuchung des Proteingehaltes gibt noch keine Auskunft darüber, ob sich die wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine während der Aufarbeitung verändert haben. Um dies zu untersuchen, werden die vier Fraktionen der Aufarbeitung gelelektrophoretisch analysiert. In der Protein-Analytik werden Zonenelektrophorese mit einem homogenen Puffersystem, Isotachophorese mit diskontinuierlichen Puffersystemen und isoelektrische Fokussierung mit pH-Gradienten verwendet (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Methoden unterscheiden sich in Aufwand und Leistungsfähigkeit der Proteintrennung, wobei die Zonenelektrophorese zwar die leistungsschwächste Methode darstellt, vom Arbeitsaufwand aber geringer ist. Da ausschließlich ein Screening der Fraktionen der Proteinisolierung durchgeführt werden soll, reicht die Trennleistung der Zonenelektrophorese aus. Verwendet wird eine vertikale Flachgel-Elektrophorese mit Polyacrylamid als Gelmatrix. Polyacrylamidgele bieten gegenüber Agarosegelen den Vorteil, klar und sehr stabil zu sein und zeigen über einen weiten Trennbereich eine gute Siebwirkung. Proteine bis 500 kDa werden je nach Konzentration des Acrylamids ideal getrennt, bei Proteinen über 800 kDa ist keine Trennung mehr möglich, da diese nicht mehr in das Gel eindringen. Die Molekülgrößen von Rohkaffee-Proteinen liegen unter 500 kDa (Clarke und Macrae, 1985). Acrylamid ist daher das ideale Trenngel.

Über die Kombination der Acrylamidgelelektrophorese mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bietet sich eine gute Trenntechnik zur Protein-Analytik (Janson und Rydén, 1998). Durch Zugabe von Detergentien wie SDS werden die Proteine denaturiert. SDS bildet mit den Proteinen über starke Wechselwirkungen einen SDS-Protein-Komplex, der als definierte Einheit im Gel migriert. Die Trennung der

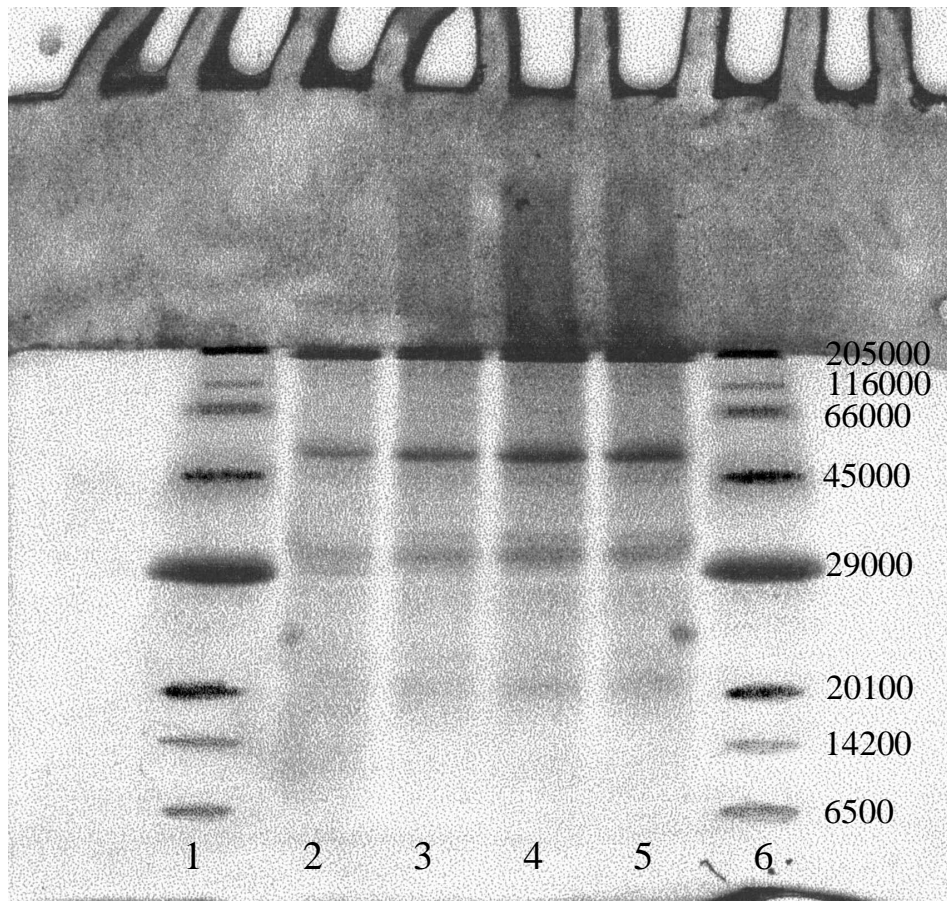


Abb. 11 SDS-PAGE der vier Fraktionen der Rohkaffeeaufarbeitung (Kaltwasserextrakt (2), Acetonfällung (3), gereinigte Acetonfällung (4), Proteinfraction der Gelchromatographie (5), Marker-Proteien (1 und 6))

Proteine im Gel erfolgt ausschließlich über ihre Molekülgröße. Daher ist die Methode ideal zur Charakterisierung von Proteinen, wenn gleichzeitig eine Kalibrierung des Gels über Standard-Proteine erfolgt. Verwendet wird eine diskontinuierliche Elektrophorese mit 5%igem Acrylamid-Sammelgel und einem 16%igen SDS-Polyacrylamid-Trenngel. Zusätzlich werden Größenmarker-Proteine im Bereich von 6500 bis 205000 Da aufgetragen, um einen Einblick in die Molekülgrößen der isolierten Rohkaffee-Proteine zu erhalten. Es zeigt sich, daß sich die Bandenmuster der vier Fraktionen entsprechen, lediglich im Bereich von 6500-14200 Da treten Verluste auf (siehe Abb. 11). Auch Arnold (1995) beobachtete bei der Isolierung der Rohkaffee-Proteine über Dialyse Verluste an „kleinen“ Proteinen.

2.1.1.2 Röstung von Rohkaffee-Proteinen

Nach der Isolierung der wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine aus der Kaffeematrix wird geprüft, ob sie wie vermutet als Bitterstoff-Prekursoren fungieren können (siehe 2.1.1). Während der Röstung unterliegen sowohl die Proteine als auch die freien Aminosäuren starken Veränderungen.

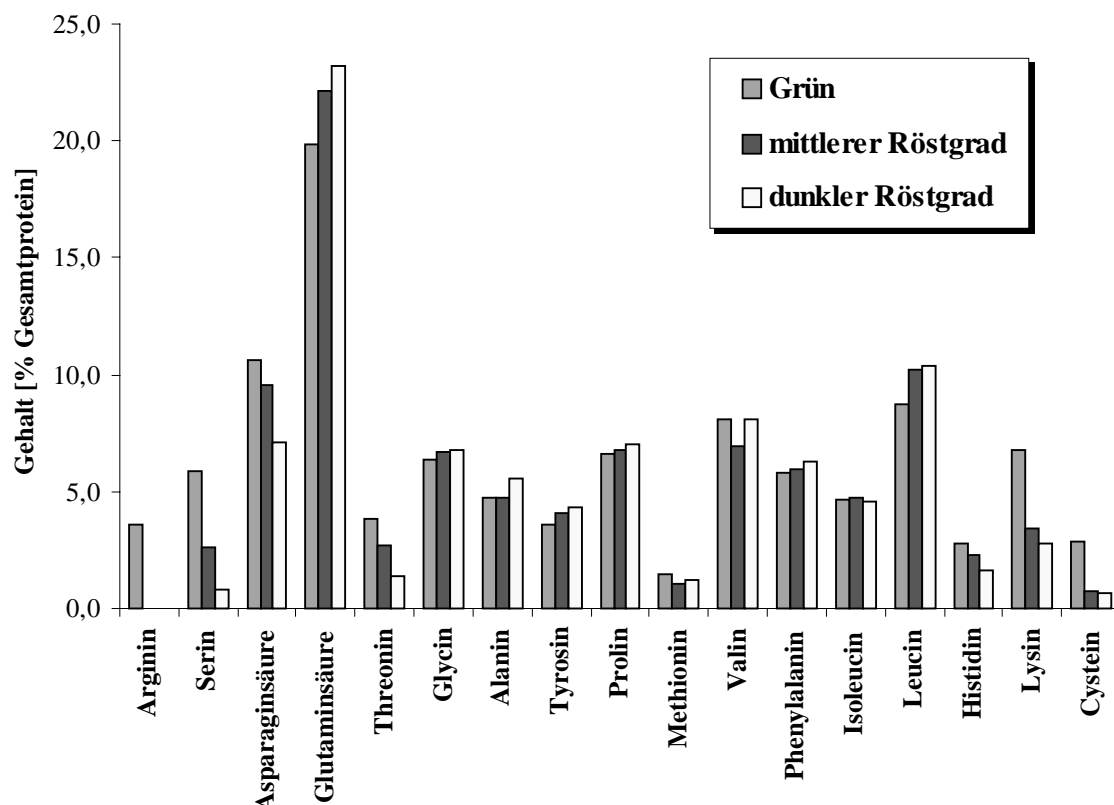


Abb. 12 Aminosäure-Gehalte in unterschiedlich stark gerösteten Kaffees
(nach Thaler und Gaigl, 1963)

Als reaktive Verbindungen werden die freien Aminosäuren bereits in der ersten Phase der Röstung vollständig umgesetzt. Im Zuge der Maillard-Reaktion und über den Strecker-Abbau sind sie in die Bildung von Aromastoffen eingebunden und wichtige Precursoren für das charakteristische Aroma des Röstkaffees (Tressl et al., 1982; MacDonald und Macrae, 1985). Die Proteine werden durch die Röstung stark verändert und in Abhängigkeit vom Röstgrad um 20-40 %, in dunkel gerösteten Kaffees bis zu 50 % abgebaut (Macrae, 1985). Genauere Untersuchungen über die Reaktionen und Veränderungen von Rohkaffee-Proteinen während

der Röstung sind bisher kaum durchgeführt worden. Aurich et al. (1967) isolierten die Huminsäure-Fraktion des Röstkaffees und identifizierten nach Hydrolyse eine Reihe von Aminosäuren. Die Aminosäureverteilung entsprach hier weitgehend der der Rohkaffee-Proteine. Sie gehen daher davon aus, daß Rohkaffee-Proteine während der Röstung zum Teil in hochmolekulare Melanoidine eingelagert werden. Die weiteren Erkenntnisse über die Proteine beschränken sich auf die Analyse der proteingebundenen Aminosäuren nach Totalhydrolyse mit 6 N Salzsäure. Bereits Thaler und Gaigl (1963) zeigten, daß sich die einzelnen Aminosäuren während der Röstung uneinheitlich verhalten. Thermisch labile Aminosäuren wie Arginin, Lysin, Serin, Threonin und Cystin werden nahezu vollständig abgebaut. Die Gehalte der stabilen Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Prolin und Valin verändern sich kaum während der Röstung bzw. nehmen sogar leicht zu (siehe Abb. 12). Spätere Untersuchungen, basierend auf neuen analytischen Methoden, bestätigen die Daten von Thaler und Gaigl (1963): Abnahmen von proteingebundenen Aminosäuren bis zu 50 % und Verluste an thermolabilen Aminosäuren (Tressl et al., 1982; MacDonald und Macrae, 1985). Wie schon im Rohkaffee, finden sich auch nach der Röstung keine signifikanten Unterschiede im Aminosäuremuster zwischen *Coffea Arabica* und *Coffea Canephora* var. *Robusta* (Thaler und Gaigl, 1963; Tressl et al., 1982; MacDonald und Macrae, 1985).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine starke Veränderung der Proteine durch die Röstung zu erwarten. Ob dies gleichbedeutend mit einer auftretenden Bitterkeit ist, sollen Modellröstungen zeigen. Die isolierten Rohkaffee-Proteine werden in einer Modellröstapparatur unter Stickstoffatmosphäre geröstet. Die Apparatur ist derart konstruiert, daß die Bedingungen eines herkömmlichen Röstprozesses weitgehend simuliert werden. Es handelt sich um ein geschlossenes System. Die Probe wird mit Seesand verrieben und der Kolben in die vorgeheizte Apparatur integriert (siehe Anhang III). Nach Einbringen der Probe wird Stickstoff eingeleitet. Die verwendeten Parameter (Temperatur und Röstzeit) werden so gewählt, daß sie dem Röstprozeß für einen dunkel gerösteten Kaffee entsprechen. Geröstet wird bei 290°C Ofentemperatur für 8 min. Es wird angenommen, daß bei diesen Bedingungen eine Produkttemperatur von ca. 240°C erreicht wird. Da keine Konvektion in dem geschlossenen System möglich ist, benötigt man eine längere Röstzeit zum Erreichen der gewünschten Rösttemperatur als in herkömmlichen Röstern. Die unter diesen Bedingungen gerösteten Rohkaffee-Proteine zeigen einen Röstverlust von durchschnittlich 15 % (siehe Anhang III). Von den gerösteten Proteinen werden Heißwasser-Extrakte hergestellt mit Extraktausbeuten von im Mittel 21 % (siehe Anhang III). Die gefriergetrockneten Extrakte

werden in einer definierten Menge Wasser aufgenommen und von dem auf Bitterkeit geschulten Sensorik-Panel auf Bitterkeit verkostet. Bei allen Verkostungen werden die Extrakte eindeutig als bitter qualifiziert. Damit ist bewiesen, daß die wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine wie andere pflanzliche und tierische Proteine (Jugel et al., 1976) unter Röstbedingungen zur Bildung bitterer Substanzen in der Lage sind.

2.1.2 Nachweis von Diketopiperazinen in gerösteten Kaffee-Proteinen

Bei einem ersten RP-HPLC-Screening der Heißwasserextrakte der gerösteten Proteine mit einem Ethanol/Wasser-Gradienten zeigt sich bei 220 nm das in Abb. 13 wiedergegebene Chromatogramm.

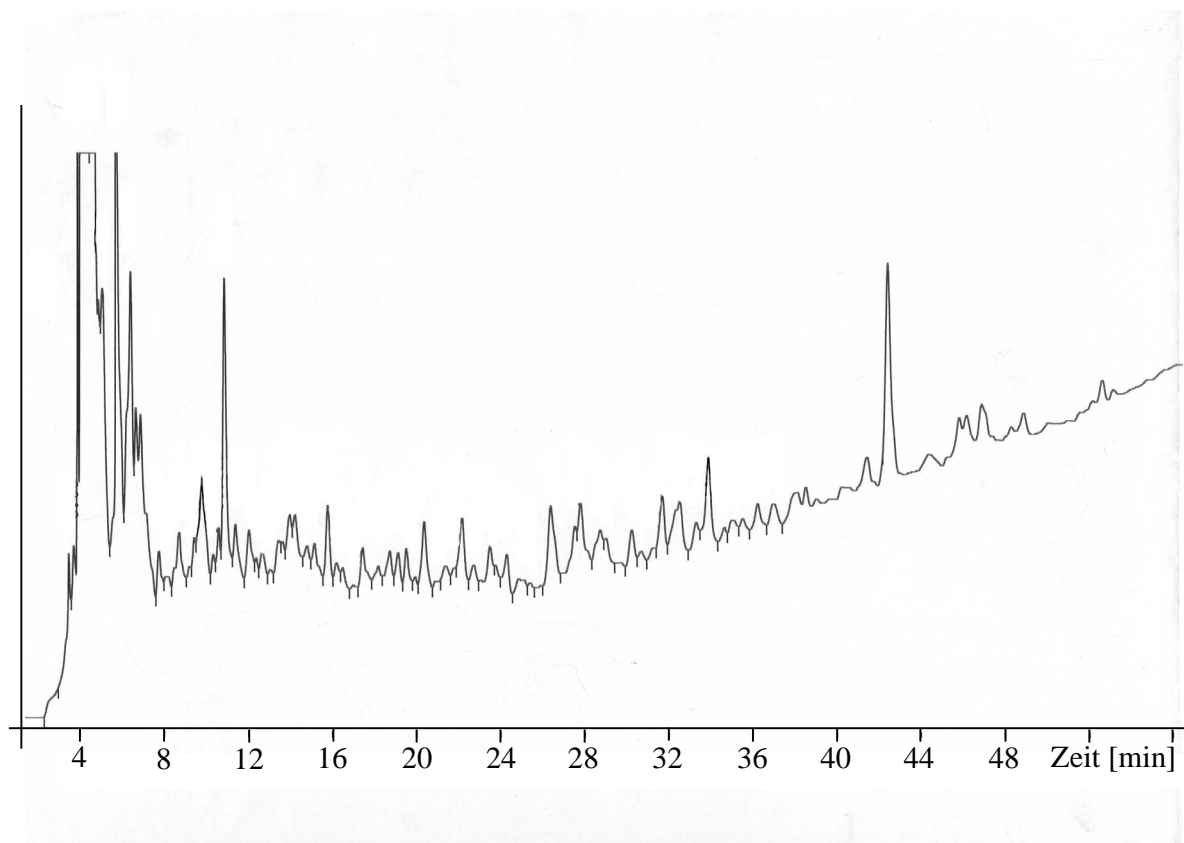


Abb. 13 RP-HPLC Chromatogramm des Heißwasserextraktes der gerösteten Kaffee-Proteine bei 220 nm

Ähnliche Chromatogramme mit einer Vielzahl an Abbauprodukten sind von enzymatisch hydrolysierten Proteinen bekannt (Molina et al., 1998). Infolge der Einwirkung verschiedener Enzyme kommt es zur Bildung von Peptiden und anderer Proteinbruchstücke, die sich bedingt

durch variierende Aminosäurezusammensetzung signifikant in ihrer Hydrophobizität unterscheiden. Beim Screening mittels RP-HPLC liefern diese Protein-Hydrolysate dementsprechend eine große Zahl an Signalen. Bei solchen Hydrolysaten ist auftretende Bitterkeit, hervorgerufen durch die gebildeten Peptide, ein großes Problem und eine Vielzahl an Arbeiten beschäftigen sich mit Wegen zur Entbitterung oder Maskierung der Bitterkeit von enzymatisch behandelten Proteinhydrolysaten (Adler-Nissen, 1986). Insbesondere Peptide mit hydrophoben Aminosäuren wie Phenylalanin, Prolin und den aliphatischen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Alanin usw. entwickeln einen starken Bittergeschmack.

Bei thermisch belasteten Proteinen sind die möglichen Reaktionen um ein Vielfaches komplexer und weit weniger verstanden. Pyrolyse, Dehydrierungen usw. sind nur ein paar der wahrscheinlich ablaufenden Reaktionen. Bis heute sind kaum Arbeiten erschienen, die sich mit den Reaktionsprodukten der Erhitzung von Proteinen allein beschäftigen. Hingegen sind eine Vielzahl an Arbeiten publiziert, die sich mit der Beteiligung von Proteinen an der Maillard-Reaktion befassen. Da die α -Aminogruppen der Aminosäuren über die Peptidkette gebunden sind und ihre Reaktivität somit stark eingeschränkt ist, sind es hier insbesondere die Seitenketten von reaktiven Aminosäuren wie Lysin und Arginin die mit ihren freien Aminogruppen als Aktivatoren für die Reaktion von Proteinen mit reduzierenden Zuckern gelten (Watkins et al., 1985; Alaimo et al., 1992; Henle et al., 1993-1997; Hofmann, 1998).

2.1.2.1 Fraktionierung der gerösteten Proteine

Infolge der Komplexität des Heißwasserextrakts der gerösteten Proteine wird eine Fraktionierung über Gelchromatographie vorgenommen. Da bei dieser Methode Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden, ist Gelchromatographie hier die Methode der Wahl. Es ist zu erwarten, daß sich ausgehend von den isolierten hochmolekularen Rohkaffee-Proteinen während der Röstung eine Vielzahl an Abbauprodukten mit variierender Molekülgröße gebildet haben. Dementsprechend sollte eine Fraktionierung über die Molekülgröße zu weniger komplex aufgebauten Fraktionen führen. Die Fraktionierung wird an Sephadex G10 durchgeführt, das die Trennung von Molekülen kleiner 700 g/mol ermöglicht; der Molekülgrößenbereich, der für die durch die Röstung aus den Rohkaffee-Proteinen gebildeten Röstprodukte erwartet werden kann. Mit Hilfe dieser Methode wird eine Fraktionierung in acht Unterfraktionen erreicht. Es können zwei braune Fraktionen ausgemacht werden. Die Ausbeuten der Fraktionen sind in Tabelle 5 bezogen auf die Aufgabemenge wiedergegeben

(vollständige Daten siehe Anhang IV). Die Wiederfindung der Methode liegt bei 86 % mit einer relativ hohen Spannweite von 9,4 %. Dies ist z.T. auf die kleine Probeneinwaage von 50 mg pro Trennung zurückzuführen. Ferner zeigt sich eine Adsorption der Probe an der Gelmatrix. Am Säulenkopf verbleibt ein brauner Rückstand im sonst weißen Gel. Insbesondere bei neuem Sephadex-Material ist die Ausbeute bedingt durch eine irreversible Adsorption von Probenmaterial an reaktive Zentren des Gels geringer. Die Fraktionierung erweist sich dennoch als reproduzierbar und die Fraktionen zeigen sich bei einem RP-HPLC Screening weit weniger komplex zusammengesetzt.

Tab. 5 Mittlere Ausbeuten der Fraktionierung der gerösteten Rohkaffee-Proteine über Gelchromatographie an Sephadex G10 in [%] bezogen auf die Aufgabemenge

Fraktion	Mittlere Ausbeute [%]
I	1,5
II	25,6
III	36,9
IV	16,4
V	3,0
VI	1,5
VII	0,5
VIII	0,1
Summe	86

2.1.2.2 LC-ESI-MS Analyse

Um einen ersten Anhaltspunkt für die Strukturen der durch die Röstung gebildeten Bittersubstanzen zu bekommen, wird ein Screening der einzelnen Fraktionen mittels LC-ESI-MS durchgeführt. Die LC-MS ist als Screening-Verfahren bei der Analyse unbekannter Substanzen die Methode der Wahl. Sie arbeitet unspezifisch und detektiert alle aus der HPLC eluierenden Substanzen, die sich unter den angelegten massenspektrometrischen Bedingungen ionisieren lassen. Zur Verfügung stand ein LC-ESI/APCI-MS System der Firma Bruker Daltonik GmbH. ESI (Electrospray Ionisation) und APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) sind Kopplungstechniken zwischen HPLC und Massenspektrometrie, die in den

letzten Jahren stark an Bedeutung und Zuverlässigkeit gewonnen haben. Es handelt sich um sanfte Ionisierungstechniken, bei denen der Analyt geringer thermischer und elektrischer Energie ausgesetzt ist und so im allgemeinen unzersetzt verdampft werden kann (näheres siehe 2.1.4.1).

2.1.2.2.1 Analyse der Gelchromatographie-Fractionen über LC-ESI-MS

Da die gerösteten Proteine einen hohen Anteil an fixierten Stickstoff enthalten, werden die LC-MS-Analysen der Gelfractionen im positiven ESI-Mode durchgeführt. Stickstoff kann leicht protoniert werden und bildet so positiv geladene Ionen, die in diesem Mode gut detektiert werden können. ESI wird hier APCI vorgezogen, da davon ausgegangen werden kann, daß in den gebildeten Substanzen genügend Stickstoff und andere funktionelle Gruppen enthalten sind, die leicht ionisiert und im ESI-Mode detektiert werden können.

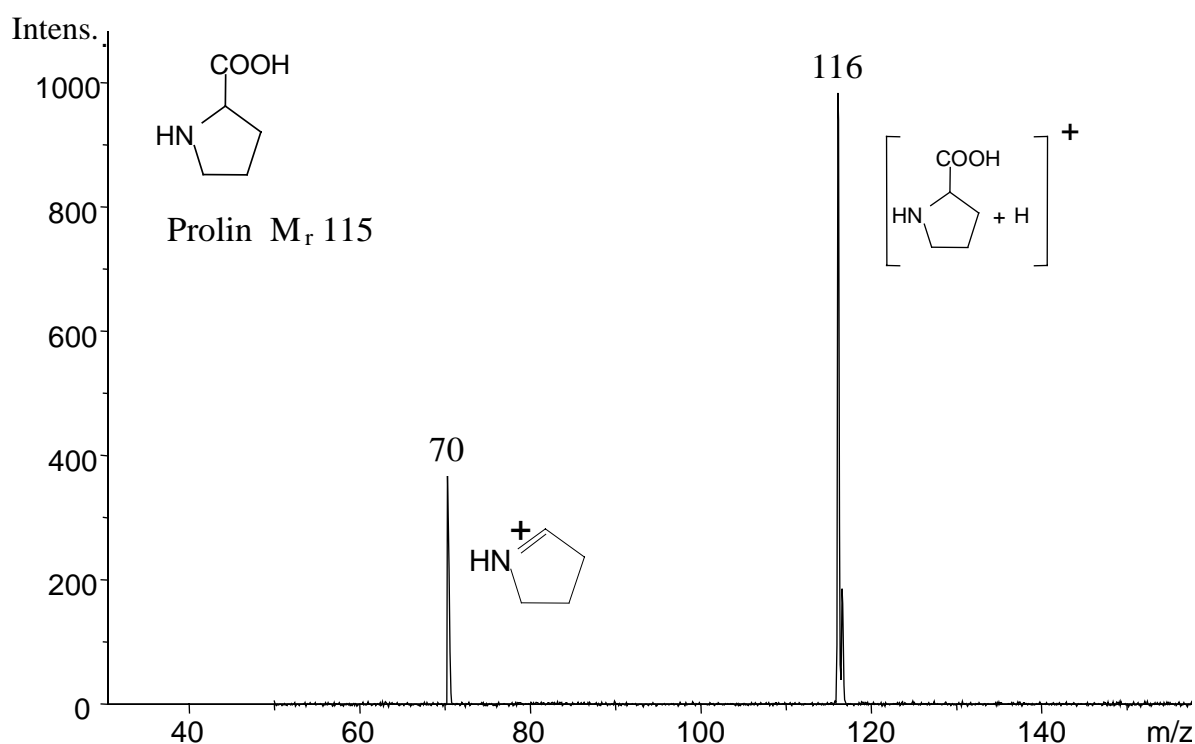


Abb. 14 MS/MS-Spektrum von L-Prolin (positiver ESI-Mode)

Die Gelfractionen werden mit dem bereits für das erste Screening verwendeten Ethanol/Wasser-Gradienten über eine RP-HPLC-Säule via ESI-MS analysiert. Bei der Auswertung der MS-Daten wird nach wiederkehrenden Fragmentierungsmustern gesucht. Sollten durch die Röstung der Proteine definierte Substanzen gebildet werden, so kann davon ausgegangen werden, daß diese aus den proteinogenen L-Aminosäuren entstehen und über Kombination verschiedener Aminosäuren verschiedene Substanzen der gleichen Substanzklasse gebildet werden, die sich im MS/MS-Mode durch charakteristische Zerfälle erkennen lassen. Um Anhaltspunkte zu erhalten, werden zuerst die thermisch stabilen Aminosäuren und einige Peptide über LC-ESI-MS vermessen und MS/MS-Spektren aufgenommen. Bei den Analysen zeigt sich, daß die einzelnen Aminosäuren im MS/MS-Spektrum charakteristische Fragmentationen bilden, wie in Abb. 14 für L-Prolin dargestellt. Durch Decarboxylierung bildet sich ein stabiles Intermediat mit der Masse 70 m/z. Ähnlich charakteristische Fragmente werden für Phenylalanin (120 m/z) und die anderen thermisch stabilen Aminosäuren erhalten (MS/MS-Spektren der untersuchten Aminosäuren

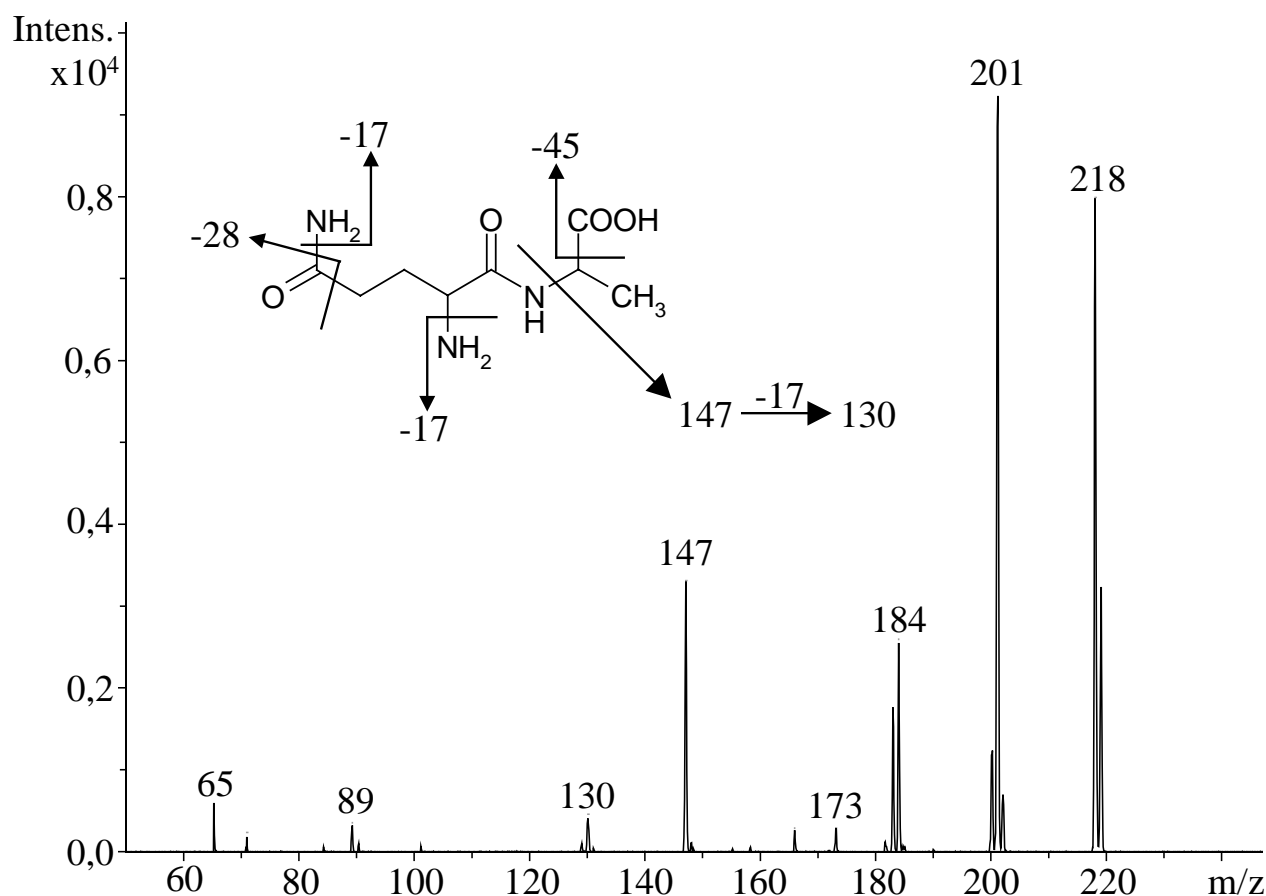


Abb. 15 Peptid-Fragmentierungen am Beispiel von L-Ala-L-Gln ($M_{\text{rel}} = 217$ g/mol)

siehe Anhang V). Bei der Analyse der Peptide zeigte sich, daß sich Peptidbindungen durch charakteristische Fragmentierungen auszeichnen. Typisch sind Abspaltungen von -17 m/z und -28 m/z vom Molekül- bzw. von Fragmentionen. Diese Fragmentierungen ergeben sich durch Öffnung der Peptidbindung und Abspaltung des Peptid-Stickstoffs als Ammoniak (-17 m/z) bzw. der C=O-Gruppe (-28 m/z), wie in Abb. 15 für das Dipeptid Alanin-Glutamin dargestellt ist. Sind im Molekül mehrere Peptidgruppen oder auch freie Aminogruppen enthalten, treten mehrere dieser Fragmentierungen vom Molekülion auf und geben einen Hinweis auf die Anzahl an Peptidbindungen im Molekül.

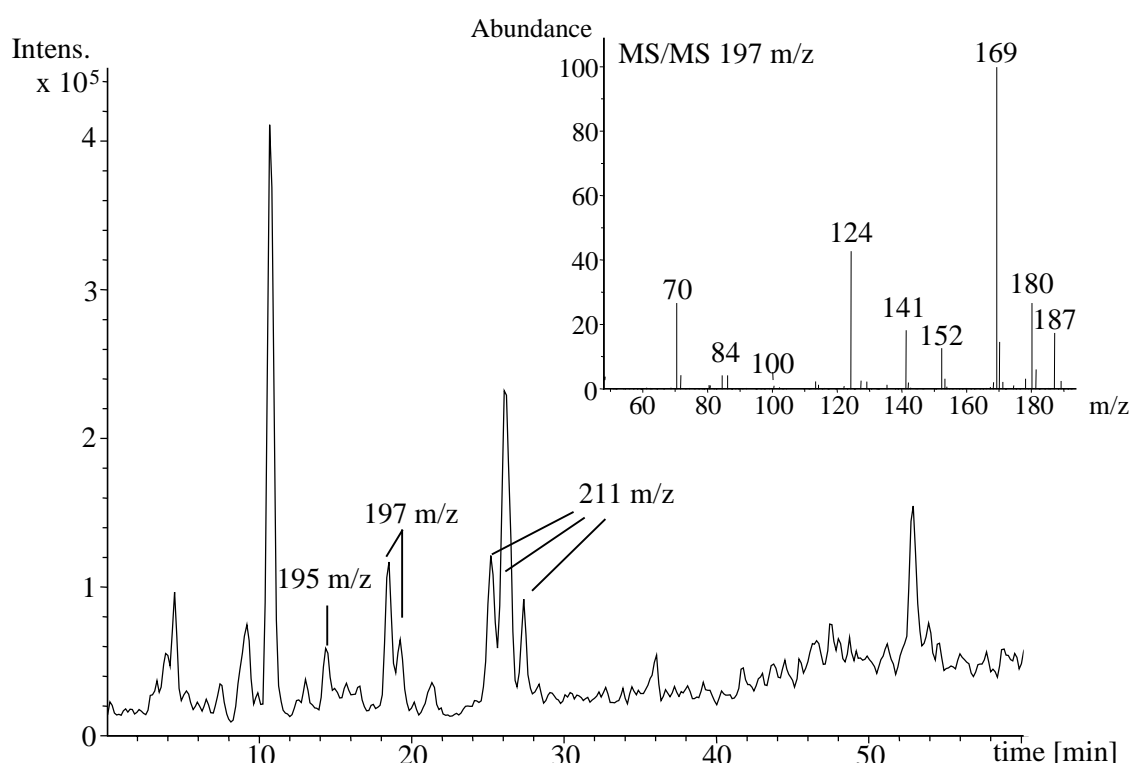


Abb. 16 Totalionenstrom der LC-ESI-MS Analyse der Sephadex G10 Fraktion III und MS/MS-Spektrum der Masse 197 m/z bei $R_t = 18,4$ min

Bei der Auswertung der MS-Daten der Gelfractionen wurde in der dritten Fraktion eine Gruppe von Substanzen identifiziert, die sich in ihren MS/MS-Spektren durch ein wiederkehrendes Fragmentierungsmuster und ein intensives 70 m/z Massenfragment auszeichnen. Eine fünfte Substanz dieser Gruppe wurde in der Fraktion IV der Sephadex-Fraktionierung nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um die Massen 195 m/z, 197 m/z, 211 m/z und 245 m/z. Interessanterweise treten die Substanzen bis auf die der Masse 195 m/z jeweils in zwei Signalen bei unterschiedlichen Retentionszeiten auf, für die Masse 211 m/z

finden sich sogar drei Signale gleicher Masse. Abbildung 16 zeigt den Totalionenstrom der Fraktion III und das Tochterionen-Spektrum der Masse 197 m/z bei der Retentionszeit von $R_t = 18,4$ min. Das Fragmentierungsmuster, eine doppelte Abspaltung von zweimal -28 m/z und -17 m/z ausgehend vom $[M+H]^+$ -Molekülion, wie es für die beiden Signale mit der Masse 197 m/z zu beobachten ist, findet sich auch für drei Signale mit der Masse 211 m/z sowie für die zwei Signale der Masse 245 m/z in der Fraktion IV der Sephadex-Fraktionierung. Ein solches Fragmentierungsmuster deutet, wie die LC-MS Analyse verschiedener Peptide gezeigt hatte (s.o.), auf das Vorhandensein von zwei Peptidbindungen im Molekül hin.

Ferner stellt in den Massenspektren der Ionen 195 m/z, 197 m/z und 211 m/z das Fragment 70 m/z ein Hauptfragment. Im MS/MS-Spektrum der Masse 195 m/z findet sich dieses nahezu ausschließlich. Das typische Fragmentierungsmuster der anderen Verbindungen kann hier nicht beobachtet werden. Dieses 70 m/z Fragment hatte sich bei der Analyse der thermisch stabilen Aminosäuren als charakteristisch für Prolin gezeigt (s.o.), sodaß auf die Anwesenheit von Prolin in den fraglichen Molekülen geschlossen werden kann. Im MS/MS-Spektrum der Masse 245 m/z ist neben dem 70 m/z Fragment das 120 m/z Fragment als Hauptfragment vorhanden, welches sich bei Analyse der Aminosäuren als typisch für Phenylalanin gezeigt hatte.

Berücksichtigt man das für Peptidbindungen typische Fragmentierungsmuster und das intensive 70 m/z Fragment in den Tochterionenspektren der Substanzen, so ist es naheliegend zu vermuten, daß es sich bei den Verbindungen um prolin-haltige Peptide handelt. Die Molekülmassen können aber weder prolin-haltigen Dipeptiden noch Tripeptiden zugeordnet werden. Beim Vergleich der Molekülmassen mit den Molekulargewichten von Prolin-Prolin, Prolin-Valin, Prolin-Leucin, Prolin-Isoleucin und Prolin-Phenylalanin Dipeptiden fällt auf, daß die Massen der Substanzen jeweils um 18 Masseneinheiten niedriger liegen als die Molekulargewichte dieser Peptide. Eine Differenz von 18 m/z Einheiten ist charakteristisch für die Abspaltung von Wasser im Molekül und deutet in diesem Fall auf eine Dehydrierung der Dipeptide hin. Diese muß, wenn zwei Peptidbindungen im Molekül enthalten sind, wie die Abspaltung von zweimal -17 m/z und -28 m/z andeutet, intramolekular erfolgen und zur Bildung cyclischer Dipeptide führen.

Solche cyclischen Dipeptide, sogenannte Diketopiperazine, sind als bittere Substanzen in anderen thermisch behandelten Lebensmitteln beschrieben worden. Pickenhagen et al. (1975) identifizierten eine Reihe an cyclischen Dipeptiden in Kakao, insbesondere prolin- und phenylalanin-haltige Diketopiperazine mit thermisch stabilen Aminosäuren (siehe 1.3.1.2).

Die Substanzen konnten ausschließlich in geröstetem Kakao, nicht in Rohkakao identifiziert werden, was auf ihre Bildung während des Kakao-Röstprozesses aus Rohkakao-Prekursoren hindeutet. Bei Röstung synthetisierter Tripeptide unter Kakao-Röstbedingungen konnten Pickenhagen et al. (1975) die Bildung von Diketopiperazinen verfolgen. Die Autoren postulieren einen Bildungsmechanismus über intramolekulare Aminolyse der N-terminalen Aminogruppe mit der zweiten N-terminalen Peptidbindung der zugrundeliegenden Proteine oder Peptide (siehe Abb. 17).

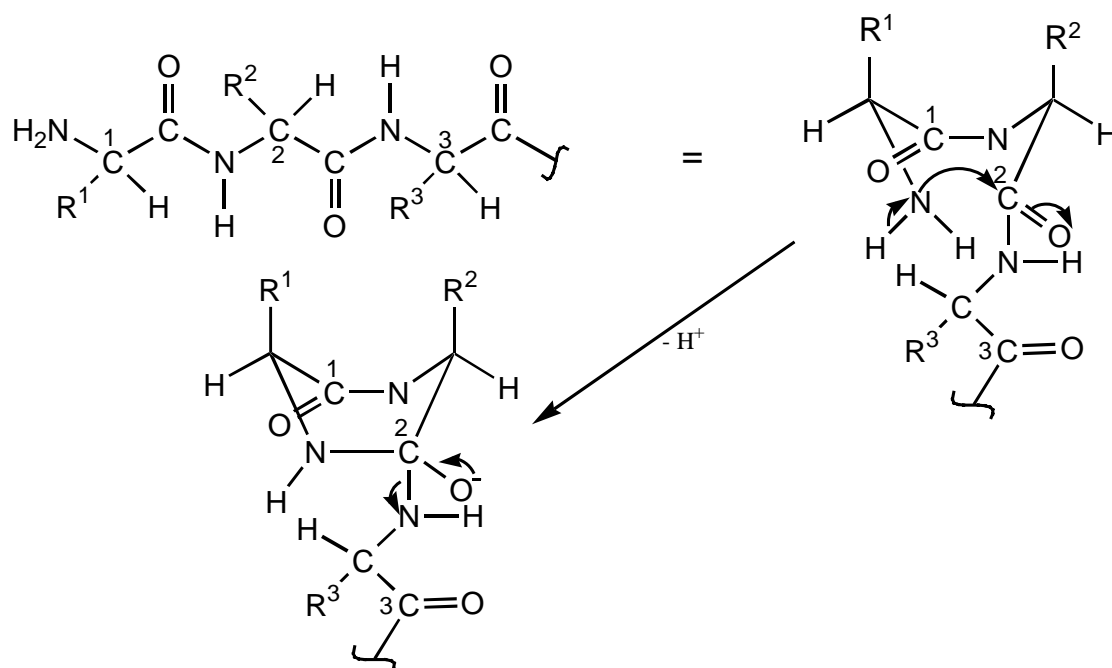


Abb. 17 Bildungsvorschlag für Diketopiperazine aus Peptid- oder Protein-Prekursoren nach Pickenhagen et al. (1975)

Rizzi (1989) quantifiziert Diketopiperazine in verschiedenen Kakaos und identifiziert für jedes Diketopiperazin zwei isomere Strukturen, bezeichnet als cis- und trans-Isomer. Durch die intramolekulare Cyclisierung liegen die beiden asymmetrischen α -C-Atome der zugrundeliegenden Aminosäuren in der gebildeten Ringebene. Die von ihnen ausgehenden Aminosäure-Reste können sich nun beide oberhalb der Ringebene orientieren und das cis-Isomer bilden bzw. im Falle des trans-Isomers sich oberhalb und unterhalb der Ringebene orientieren (siehe Abb. 18). Das Auftreten der trans-Isomere erklärt Rizzi mit einer Razemisierung. Da Peptide und Proteine ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, sollten bei einer intramolekularen Cyclisierung ausschließlich cis-Diketopiperazine entstehen.

Rizzi (1989) geht daher von einer Umlagerung des primär gebildeten cis-Isomers zum trans-Isomer während des Röstprozesses aus. Rizzi stellt ferner bei der Quantifizierung der Diketopiperazine einen stetigen Anstieg der Diketopiperazin-Gehalte mit zunehmendem Röstgrad fest, mit den höchsten Gehalten in hoch gerösteten Ghana und Bahia Kakaos.

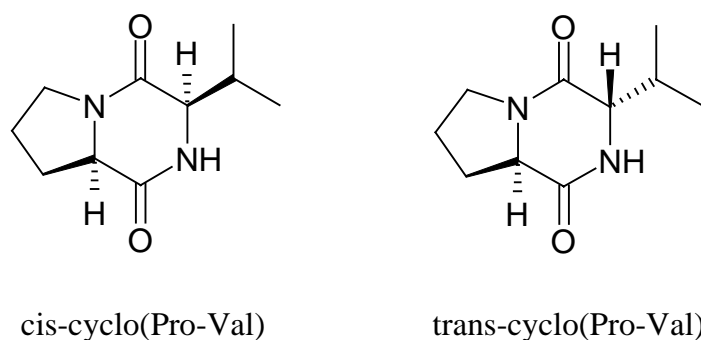


Abb. 18 Isomere von cyclo(Pro-Val)

Neben Kakao konnten Diketopiperazine in Sake (Takahasi et al., 1974), verschiedenen Getreidekörnern (Dansi et al., 1970) und anderen Lebensmitteln identifiziert werden. Gautschi und Schmid (1997) identifizierten sieben prolin-haltige Diketopiperazine in verschiedenen Bieren. Sie konnten zeigen, daß die Gehalte dieser Diketopiperazine bei Bieren, die mit stärker gedarrtem Malz hergestellt werden, signifikant höher liegen als bei solchen mit nur schwach gedarrtem Malz. Der Geschmack der Verbindungen wird in Konzentrationen von 10-50 ppm als bitter, adstringierend, metallisch beschrieben. Diketopiperazine sind demnach in thermisch behandelten Lebensmitteln weit verbreitet und ihr Auftreten in den gerösteten Kaffee-Proteinen damit durchaus denkbar. Daher ist zu vermuten, daß es sich bei den Substanzen in Fraktion III und IV der Gelfraktionierung um die fünf Diketopiperazine cyclo(Pro-Val), cyclo(Pro-Leu), cyclo(Pro-Ile), cyclo(Pro-Pro) und cyclo(Pro-Phe) handelt (Abb. 19).

Um dies zu bestätigen, werden die entsprechenden Referenz-Substanzen synthetisiert (siehe 2.1.5) und mittels LC-ESI-MS analysiert. Die synthetisierten cis-Diketopiperazine haben identische Retentionszeiten und Molekülmassen mit den Signalen aus den Fraktionen III und IV der Sephadex-Fraktionierung; auch die MS/MS-Spektren sind identisch. In Abb. 20a ist das MS/MS-Spektrum der cis-cyclo(Pro-Leu)-Referenz (211 m/z) dem MS/MS-Spektrum aus der Fraktion III bei gleicher Retentionszeit und gleicher Molekülmasse in Abb. 20b gegenübergestellt. Sowohl das Fragmentierungsmuster als auch die Intensitäten der einzelnen Fragmente entsprechen sich. Gleiches wird für die synthetisierten Diketopiperazine cis-

cyclo(Pro-Ile), cis-cyclo(Pro-Val), cis-cyclo(Pro-Pro) und cis-cyclo(Pro-Phe) beim Vergleich mit den Retentionszeiten, Molekülmassen und MS/MS-Spektren der fraglichen Signale in den Sephadex-Fractionen III und IV festgestellt. Somit können die Diketopiperazine als Röstprodukte aus wasserlöslichen Rohkaffee-Proteinen identifiziert werden.

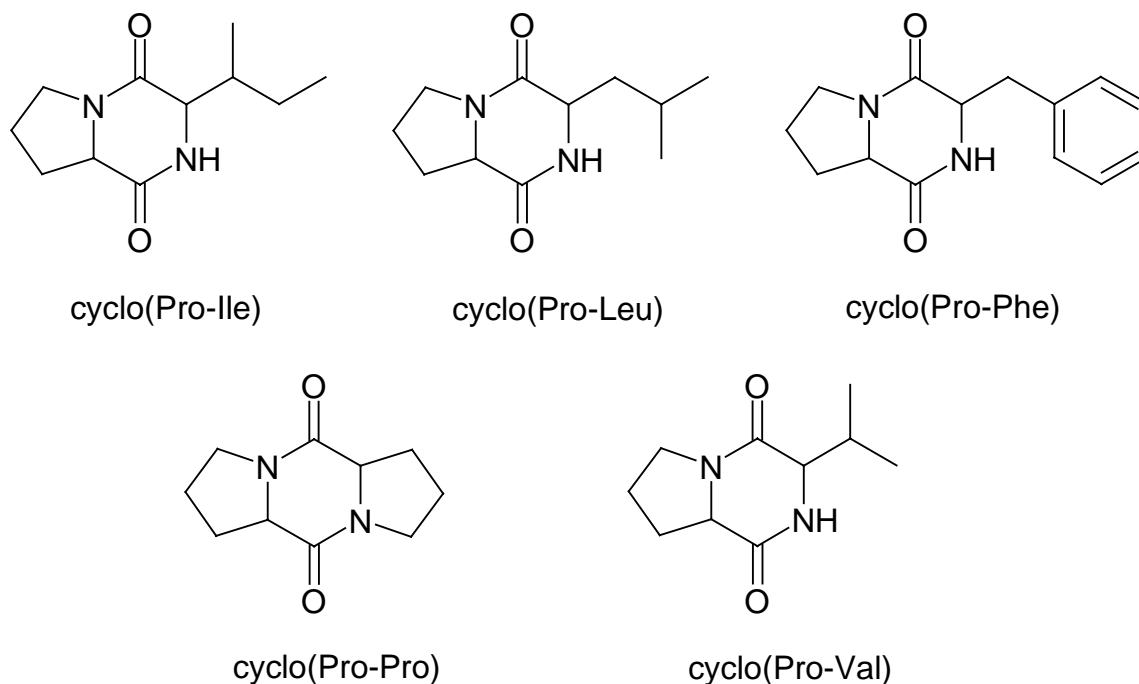


Abb. 19 Strukturen der Diketopiperazine in den gerösteten Kaffee-Proteinen

Wie schon von Rizzi (1989) für einige Diketopiperazine in Kakao gefunden, treten hier alle identifizierten Diketopiperazine in beiden möglichen isomeren Formen auf, als cis- und als trans-Isomer. Vergleiche mit den synthetisierten trans-Diketopiperazinen identifizieren den jeweils noch nicht zugeordneten Peak der fünf Substanzen als das dem cis-Isomer zugehörige trans-Isomer. Lediglich im Falle von cyclo(Pro-Pro) ist eine Trennung der beiden Isomeren nicht möglich. Auch durch Variation der HPLC-Bedingungen kann diese nicht erreicht werden. Da bei den anderen vier Diketopiperazinen beide isomeren Formen nachgewiesen werden konnten, ist aber auch für cyclo(Pro-Pro) die Anwesenheit beider Isomere wahrscheinlich.

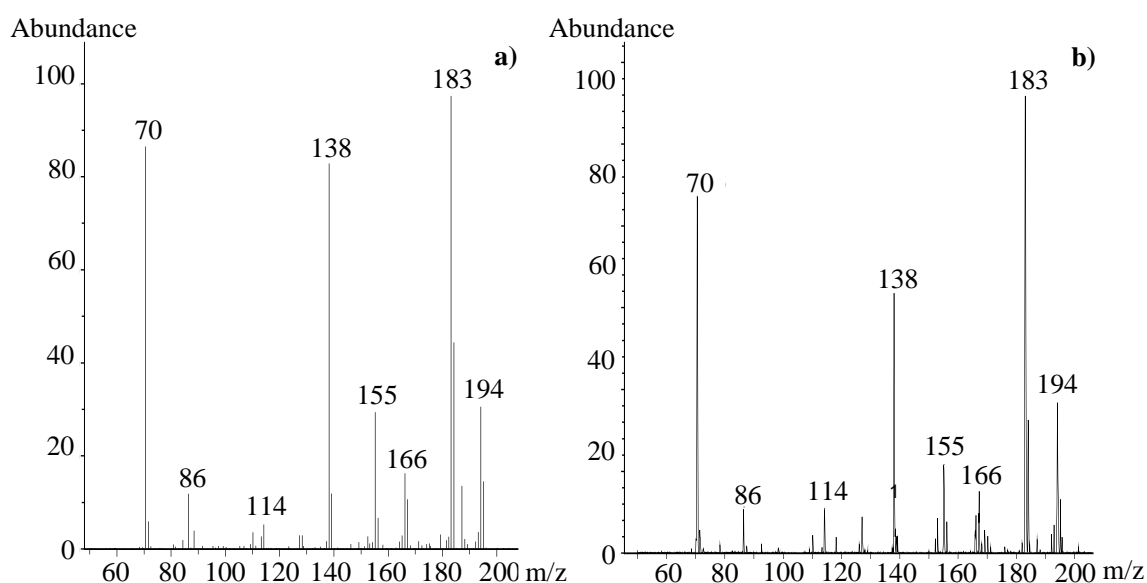


Abb. 20 MS/MS-Spektren der cis-cyclo(Pro-Leu) Referenz (a) und der Substanz mit gleicher Molekülmasse und gleicher Retentionszeit in Fraktion III der Sephadex-Fraktionierung der gerösteten Kaffee-Proteine (b)

2.1.2.3 Nachweis von Diketopiperazinen über GC-EI-MS

Rizzi (1989) nutzt GC-EI-MS zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diketopiperazinen in Kakao. Die Methode bietet sich an, da sich Diketopiperazine unzersetzt verdampfen lassen und somit auch aus einer komplexen Matrix, wie Kakao, relativ leicht bestimmbar sind. Unter Verwendung einer apolaren RTX-5 Säule kann Rizzi die meisten Diketopiperazine teilweise auch deren Isomere trennen. Gautschi und Schmid (1997) beschreiben eine GC-EI-MS-Methode zur Charakterisierung der prolin-haltigen Diketopiperazine in Bier. Die Trennung von cyclo(Pro-Pro) und cyclo(Pro-Leu) gelingt mit der verwendeten DB-1 Säule allerdings nicht.

Für Kaffee ist aber eine Trennung von cyclo(Pro-Pro) und cyclo(Pro-Leu) sowie deren Isomeren nötig. In Anlehnung an die Vorschrift von Gautschi und Schmid (1997) wird eine Methode entwickelt, die diese Voraussetzungen erfüllt und die Trennung der fünf prolin-haltigen Diketopiperazine ermöglicht. Gearbeitet wird mit einer 60 m x 0,25 mm DB-5 MS Säule (siehe Material und Methoden). Mit dem gewählten Temperaturprogramm wird die Trennung der fünf prolin-haltigen Diketopiperazine, z.T. auch ihrer Isomere, erreicht. Wie schon bei der RP-HPLC wird für cyclo(Pro-Pro) nur ein Signal gefunden (siehe auch 2.1.4).

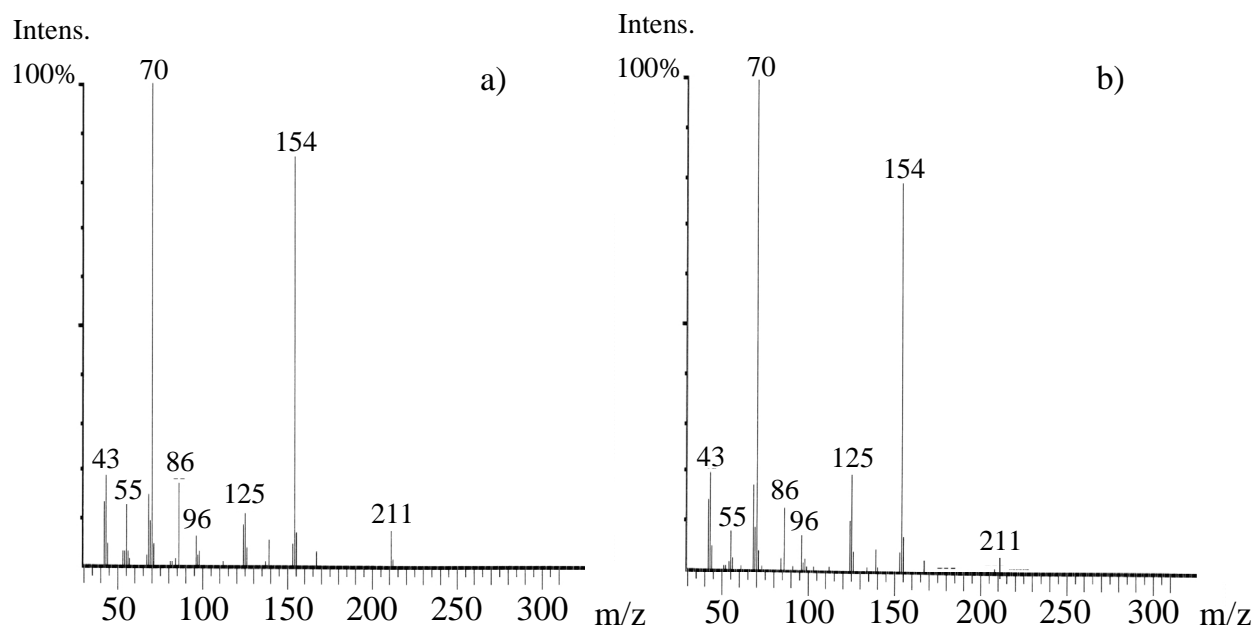


Abb. 21 GC-MS-Analyse: EI-Massenspektren der *cis*-cyclo(Pro-Leu) Referenz (a) und der Sephadex-Fraktion III bei gleicher Retentionszeit (b)

Für die GC-EI-MS Analyse werden die Fraktionen der Sephadex G10 Fraktionierung in Chloroform aufgenommen, direkt vermessen und mit dem aufgenommenen Diketopiperazin-Mischstandard verglichen. Die Retentionszeiten wie auch die EI-MS-Spektren der Referenz-Diketopiperazine zeigen sich mit den als Diketopiperazinen identifizierten Signalen in den Sephadex G10 Fraktionen III und IV identisch. Abb. 21a zeigt das EI-Massenspektrum der Referenz von *cis*-cyclo(Pro-Leu) und Abb. 21b das EI-Massenspektrum des Chloroform-Extraktes der Fraktion III der Sephadex-Fraktionierung bei gleicher Retentionszeit. Wie bei den LC-ESI-MS Analysen sind die Massenspektren der Referenz-Substanzen mit denen des Chloroform-Extraktes der Sephadex-Fraktionen identisch. Diese Übereinstimmung wurde für alle analysierten Diketopiperazine erhalten. Weiterhin stimmen die erhaltenen MS-Spektren mit den Angaben von Gautschi und Schmid (1997) überein. Somit kann die bereits mittels LC-ESI-MS erfolgte Identifizierung der fünf prolin-haltigen Diketopiperazine cyclo(Pro-Ile), cyclo(Pro-Leu), cyclo(Pro-Phe), cyclo(Pro-Pro) und cyclo(Pro-Val) in beiden isomeren Formen mit einer zweiten unabhängigen Methode abgesichert und bestätigt werden.

2.1.3 Nachweis von Diketopiperazinen in Röstkaffee

Die Röstung der isolierten Kaffee-Proteine und der Nachweis der bitteren Diketopiperazine hat gezeigt, daß die Kaffee-Proteine unter Röstbedingungen zur Bildung dieser cyclischen Peptide in der Lage sind. In der Kaffeematrix ist eine Inhibition dieser Abbaureaktion durch Konkurrenzreaktionen aber nicht auszuschließen. Infolge der Vielzahl an möglichen Reaktionspartnern im Rohkaffee (insbesondere der Kohlenhydrate) und der unüberschaubaren Anzahl an ablaufenden Reaktionen während des Röstprozesses ist der Nachweis der Diketopiperazine im Röstkaffee zu führen.

2.1.3.1 Allgemeine Röstkaffee-Fraktionierung

Da über den Hauptanteil an Bitterstoffen im Röstkaffee strukturell keine Kenntnis besteht, wird Röstkaffee einer mehrstufigen Fraktionierung unterzogen und die Fraktionen sensorisch auf Bitterkeit verkostet. Chen (1979) erarbeitete eine Fraktionierung von Röstkaffee mit dem Ziel der Identifizierung von Bitterstoffen im Kaffee. Die Methode basiert auf Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und Säulenchromatographie. Entsprechend den sensorischen Analysen erreicht Chen eine gute Anreicherung der Bitterstoffe, ohne einen größeren Teil der Gesamtbitterkeit des Kaffegetränks zu verlieren. Basierend auf seinen Arbeiten wird eine Röstkaffee-Fraktionierung nach dem in Abb. 22 dargestellten Schema, ausgehend von einem haushaltsüblichen Kaffeeaufguß, durchgeführt. Je nach verwendetem Kaffee und verwendeter Aufgußtechnik sind die Ausbeuten unterschiedlich. Die Analysen werden mit einem selbstgerösteten Brazil Arabica durchgeführt. Es ist bekannt, daß die Bitterkeit positiv mit dem Röstgrad des Kaffees korreliert (Chen, 1979), und daher ist zu erwarten, daß sich in dunkel gerösteten Kaffees höhere Gehalte an Bitterstoffen finden. Der Brazil wird bei 290°C geröstet, um einen Kaffee hohen Röstgrads zu erhalten. Der Röstverlust liegt bei 23 %. Infolge des höheren Röstgrads liegen die Ausbeuten der Heißwasserextraktion höher als die von Chen erzielten Werte (1979). Folgend wird der gefriergetrocknete Heißwasserextrakt mit Methanol extrahiert. Chen hatte verschiedene Lösungsmittel auf ihre Eignung zur Anreicherung der Kaffee-Bitterstoffe getestet. Mit Methanol wird von allen getesteten Lösungsmitteln die beste Anreicherung der Kaffee-Bitterstoffe bei gleichzeitig minimalen Verlusten an Gesamtbitterkeit erreicht. Die Extraktion mit Methanol liefert reproduzierbar kleinere Werte (54 %) als Chen (59 %) sie erhalten hat. Dies läßt sich vermutlich mit einem reduzierten Gehalt an extrahierbaren Chlorogensäuren im hoch gerösteten Brazil Arabica

erklären. Chlorogensäuren werden während der Röstung zunehmend abgebaut. Da sie sich gut mit Methanol extrahieren lassen, ist im hoch gerösteten Brazil ein niedrigerer Anteil dieser Substanzen zu erwarten, der in einer geringeren methanolischen Extraktausbeute resultieren sollte.

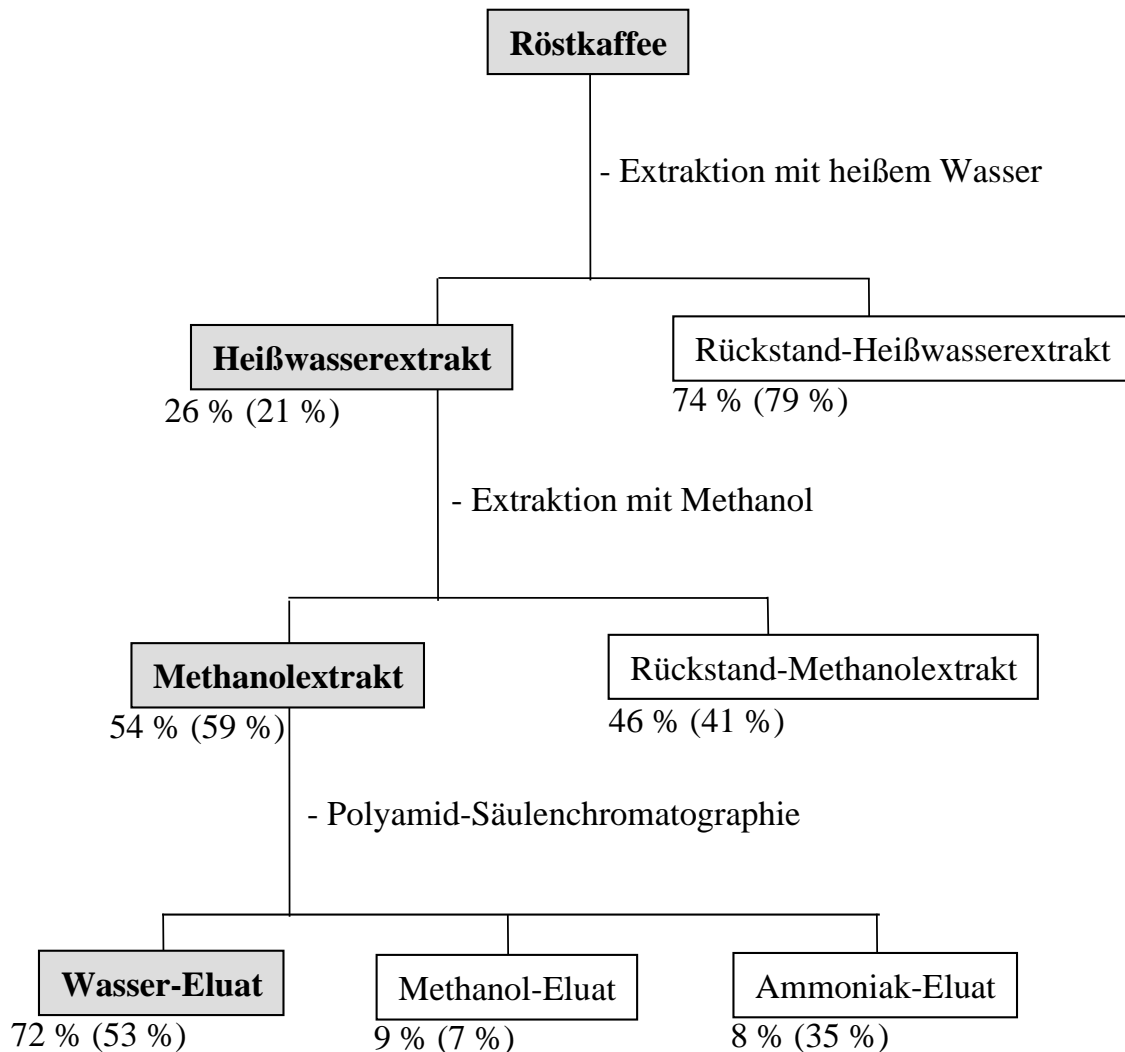


Abb. 22 Röstkaffee-Fraktionierung; Ausbeuten in [%],
in Klammern Daten nach Chen (1979)

Die folgende Polyamidsäulen-Chromatographie bestätigt diese Einschätzung. Während Chen 53 % des angegebenen Methanolextraktes im Wasser-Eluat der Polyamidsäule findet, liegen die Ausbeuten bei der durchgeführten Aufarbeitung mit 72 % signifikant höher; die Gehalte im Ammoniak-Eluat entsprechend niedriger. Da Polyamid mit phenolischen Substanzen in Wechselwirkung tritt, deutet dies auf einen reduzierten Anteil an phenolischen Substanzen, und damit vor allem an Chlorogensäuren, im hochgerösteten Brazil Arabica hin (siehe 2.2.5).

Ausführliche Daten der einzelnen Fraktionen finden sich in Anhang VI. Die Fraktionen der Aufarbeitung werden von einem auf Bitterkeit trainierten Sensorik-Panel auf Bitterkeit untersucht (siehe auch 2.1.6). Wie von Chen (1979) beschrieben, zeigen alle Fraktionen der Aufarbeitung bitteren Geschmack (siehe Tab. 6). Auf eine Verkostung des Ammoniak-Eluats wurde verzichtet, da Chlorogensäuren und andere phenolische Substanzen, die in dieser Fraktion zu finden sein sollten, unter alkalischen Bedingungen sehr reaktiv sind. Dementsprechend sollten durch die Elution mit 10%igem Ammoniak bereits Umlagerungen und andere Reaktionen ablaufen und sich die Fraktion dadurch stark verändern.

Tab. 6 Bitterkeits-Erkennungsschwellenwerte der Fraktionen der Röstkaffee-Fraktionierung im Vergleich mit den Werten von Chen (1979)

Fraktion	Bitterkeits-Erkennungsschwelle [g/L]	
	Eigene Werte	Chen (1979)
Heißwasserextrakt	0,68	1,4
Methanolextrakt	0,46	0,85
Wasser-Eluat der Polyamidsäule	0,47	0,80
Methanol-Eluat der Polyamidsäule	0,14	n.b.

Wie zu erwarten, liegen die bei der Aufarbeitung des Brazil Arabica gefundenen Bitterkeits-Erkennungsschwellen signifikant unter den Schwellen der Fraktionen der Chen-Aufarbeitung. Dies bestätigt die bereits erwähnte Beobachtung, daß höher gerösteter Kaffee höhere Gehalte an Bitterstoffen enthält (Chen, 1979). Interessant ist vor allem, daß Bitterkeit sowohl im Wasser-Eluat wie auch im Methanol-Eluat der Polyamidsäule festgestellt wurde. Dies spricht für die strukturelle Vielfalt der Kaffee-Bitterstoffe, die in der Literatur diskutiert wird (siehe 1.3.3). Im Wasser-Eluat der Polyamidsäule konnte Chen als Hauptkomponente Coffein nachweisen und führt zumindest einen Teil der Bitterkeit darauf zurück; weitere Bitterstoffe wurden weder im Wasser-Eluat noch im Methanol-Eluat der Polyamidsäule identifiziert.

2.1.3.2 Fraktionierung zum Nachweis von Diketopiperazinen in Röstkaffee

Gemäß den physikalischen Eigenschaften der prolin-haltigen Diketopiperazine sollten sich die Substanzen im Wasser-Eluat der Polyamidsäule finden. Eine Wechselwirkung mit Polyamid ist ausgeschlossen. Da die Struktur der Substanzen bekannt ist, wird die weitere Fraktionierung des Wasser-Eluats ihren physikalischen Eigenschaften angepaßt (siehe Abb. 23).

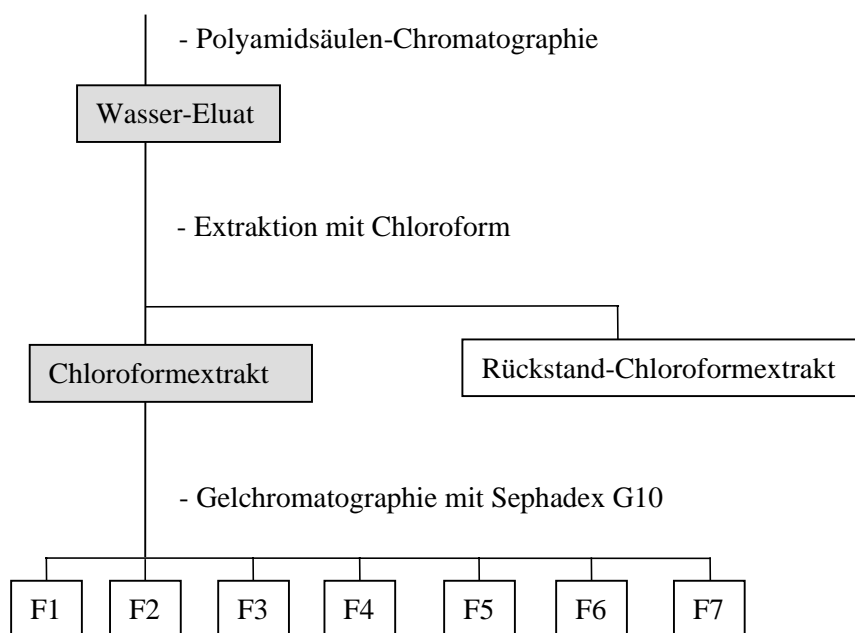


Abb. 23 Fraktionierung des Wasser-Eluats der Polyamidsäule zur Aufkonzentrierung von Diketopiperazinen in Röstkaffee

Das Wasser-Eluat wird zuerst mit Chloroform extrahiert. Pickenhagen et al. (1975) nutzten die Extraktion mit Chloroform zur Anreicherung der Diketopiperazine in Kakao und auch Gautschi und Schmid (1997) erreichen durch Extraktion mit chlorierten Lösungsmitteln eine Anreicherung der in Bier identifizierten prolin-haltigen Diketopiperazine aus der Biermatrix. Bei den durchgeführten Synthesen der Diketopiperazin-Referenzen (siehe 2.1.5) hatte sich die gute Löslichkeit der synthetisierten prolin-haltigen Diketopiperazine in Chloroform bestätigt, sodaß über die Extraktion mit Chloroform eine Anreicherung der DKPs erreicht werden sollte. Neben den vermuteten Diketopiperazinen wird auf diesem Weg auch das Coffein extrahiert. Der Extrakt wird von Chloroform befreit, in Methanol/Wasser aufgenommen und über Gelchromatographie fraktioniert. Die Fraktionierung hatte sich bei der Identifizierung

der Diketopiperazine in den Kaffee-Proteinen bewährt (siehe 2.1.2) und wird hier analog durchgeführt.

2.1.3.3 LC-ESI-MS Analyse

Der Chloroform-Extrakt und die Fraktionen der Gelchromatographie werden über LC-ESI-MS auf die Anwesenheit der prolin-haltigen Diketopiperazine hin analysiert. Die verwendete Methode entspricht der unter 2.1.2.2 beschriebenen. Die Analysen belegen die Anwesenheit der Diketopiperazine in den Fraktionen III und IV. In Abb. 24 ist der Totalionenstrom des Chloroform-Extrakts des Wasser-Eluats der Polyamidsäule

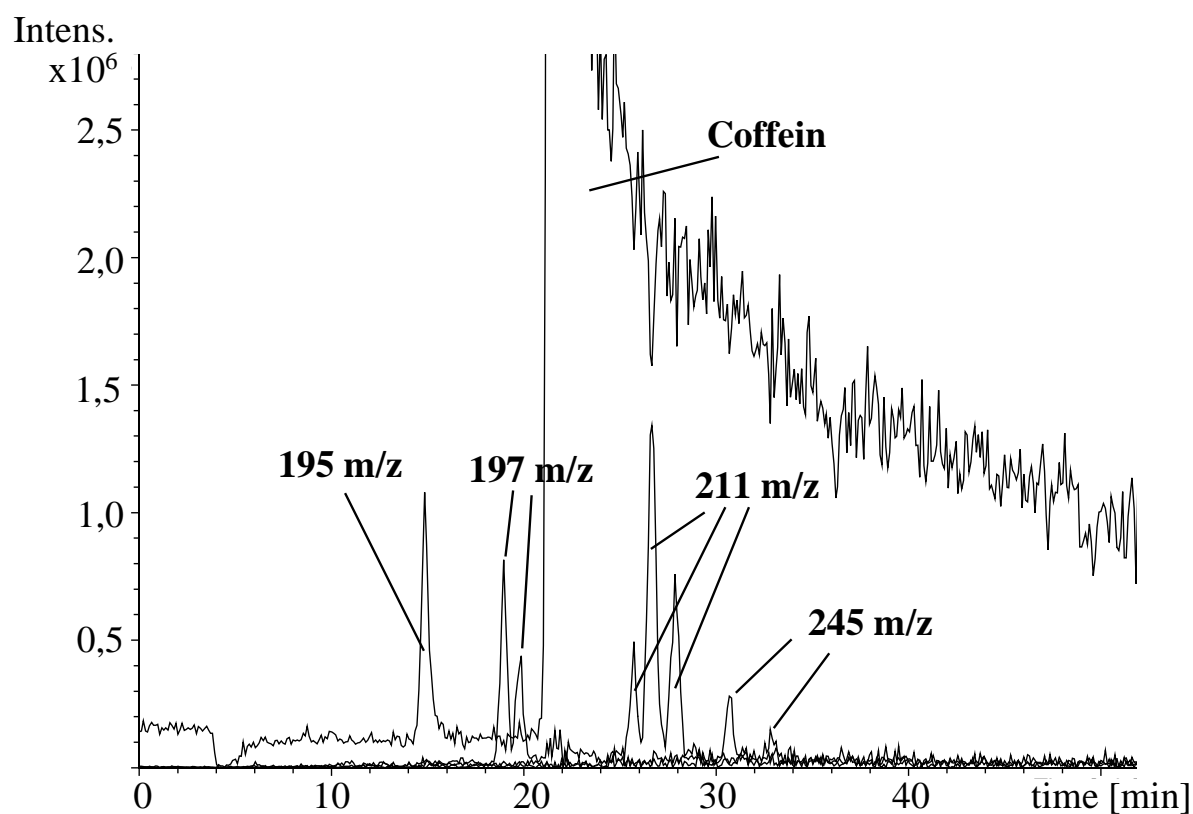


Abb. 24 Totalionenstrom und Massenspektren 195 m/z, 197 m/z, 211 m/z und 245 m/z im Chloroformextrakt

wiedergegeben. Die Signale von cyclo(Pro-Pro) (195 m/z), cyclo(Pro-Val) (197 m/z), cyclo(Pro-Leu) (211 m/z), cyclo(Pro-Ile) (211 m/z) und cyclo(Pro-Phe) (245 m/z) sind zu erkennen. Problematisch ist in diesem Zusammenhang das große Coffein-Signal. Coffein wird unter den verwendeten LC-ESI-MS Bedingungen empfindlich detektiert und zeigt einen starken „Memory-Effekt“ im Massenspektrometer. Dies resultiert in einem großen Signal, welches nachfolgend eluierende Substanzen überlagert.

Wie schon bei der Analyse der Sephadex-Fractionen der gerösteten Kaffee-Proteine (siehe 2.1.2.2.1) finden sich in Fraktion III und IV der Gelchromatographie die Signale der prolinhaltigen Diketopiperazine. Coffein koeluiert mit den Diketopiperazinen in Fraktion III und gibt ein ähnlich großes Signal wie im Chloroform-Extrakt. In Fraktion IV ist es nicht mehr enthalten und die Diketopiperazine bilden die Hauptsignale. Beim Vergleich eines Mischstandards der synthetisierten Referenz-Verbindungen mit Fraktion IV decken sich Retentionszeiten und Molekülmassen. Ferner sind die MS/MS-Spektren der Verbindungen in ihren Fragmentierungen identisch wie in Abb. 25 für cis-cyclo(Pro-Phe) dargestellt ist.

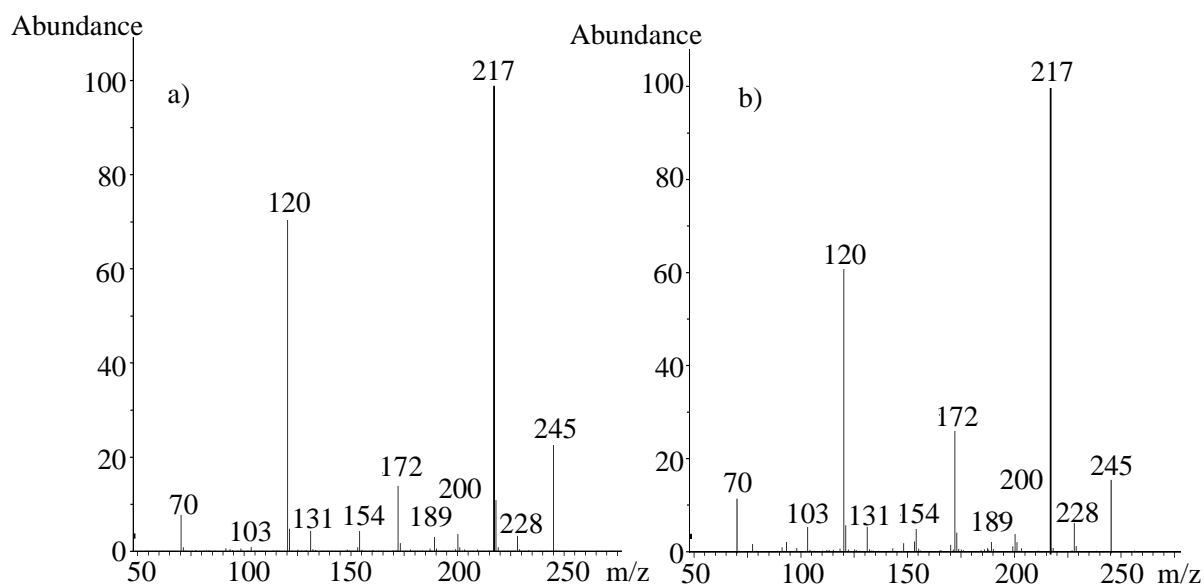


Abb. 25 MS/MS-Spektren der cis-cyclo(Pro-Phe) Referenz (a) und dem entsprechenden Signal von 245 m/z in Fraktion IV der Sephadex Fraktionierung

Somit können die Diketopiperazine auch in Röstkaffee nachgewiesen werden. Wie bei den gerösteten Rohkaffee-Proteinen finden sich beide möglichen Isomeren eines jeden Diketopiperazins, allerdings in anderen Verhältnissen. Während in den gerösteten Proteinen die cis-Isomere überwiegen, ist im untersuchten Kaffee der Anteil der trans-Isomere höher und im Falle von cyclo(Pro-Phe) übersteigt der Gehalt des trans-Isomers den des cis-Isomers. Dies läßt einen Zusammenhang der Isomerengehalte mit dem Röstgrad vermuten. Eventuell kommt es mit zunehmender Hitzeeinwirkung während der Röstung zu einer Umlagerung der Isomeren, wie Rizzi (1989) sie schon für die in Kakao identifizierten Diketopiperazine postuliert hat (siehe 2.1.2.2.1).

2.1.3.4 GC-EI-MS Analyse

Die Identifizierung der prolin-haltigen Diketopiperazine wird mit der unter 2.1.2.3 beschriebenen GC-EI-MS Methode überprüft. Zur Analyse wird der Chloroform-Extrakt des Wasser-Eluats der Polyamidsäule eingesetzt. In Abb. 26 ist der Totalionenstrom der Analyse dargestellt.

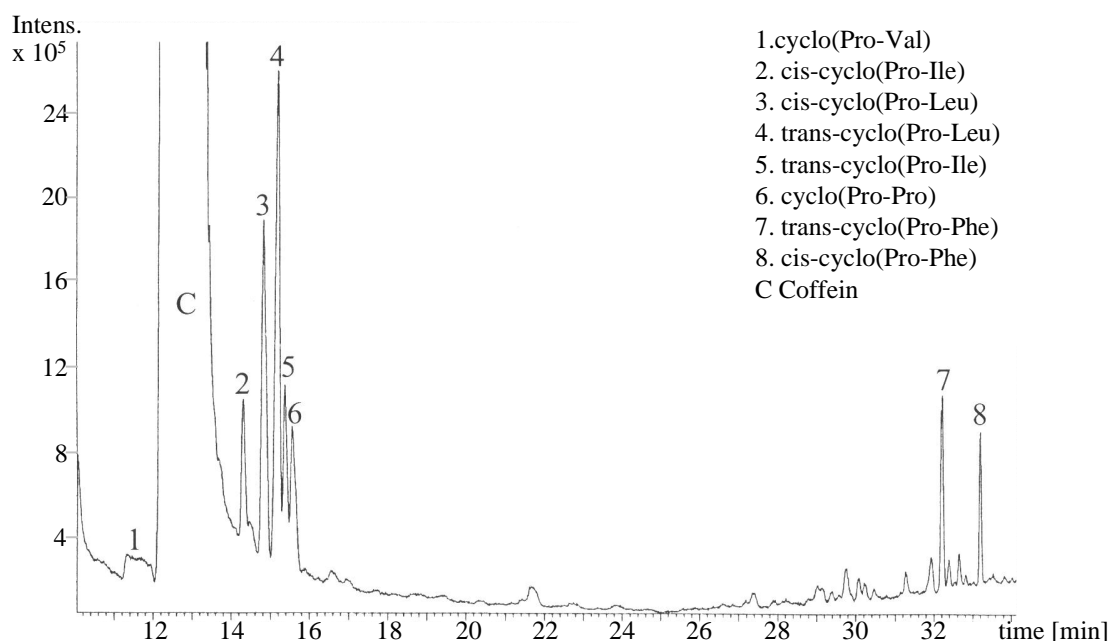


Abb. 26 Totalionenstrom der GC-EI-MS Analyse des Chloroform-Extrakts des Wasser-Eluats der Polyamidsäule, entsprechend der allgemeinen Röstkaffee-Aufarbeitung (siehe 2.1.3.1)

Das Chromatogramm wird, wie schon in der LC-ESI-MS Analyse deutlich wurde, vom Coffein-Signal dominiert. Die Signale der prolin-haltigen Diketopiperazine sind dennoch gut zu erkennen. Die EI-Spektren decken sich mit denen der synthetisierten Referenz-Verbindungen und bestätigen die Identifizierung der DKPs im Röstkaffee.

2.1.4 Quantifizierung von Diketopiperazinen in Röstkaffees

Um die Relevanz der Diketopiperazine für den bitteren Geschmack des Kaffeegetränks einschätzen zu können, müssen die Substanzen quantifiziert und sensorisch untersucht werden.

2.1.4.1 Quantifizierung mittels LC-ESI-MS

Die Quantifizierung über LC-ESI-MS bietet sich an, da die Methode sich für den Nachweis der Diketopiperazine in den gerösteten Kaffee-Proteinen und im Röstkaffee bewährt hatte. Ferner war die Trennung der zu untersuchenden prolin-haltigen Diketopiperazine mit der verwendeten Screening-Methode erfolgreich, sodaß eine Quantifizierung der Substanzen durch Optimierung der Methodenparameter und der Probenaufarbeitung gelingen sollte.

2.1.4.1.1 Grundlagen der Methode

Während in den 70er und 80er Jahren die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie noch größere Probleme bereitete, stehen heute mehrere ausgereifte Kopplungstechniken zur Verfügung. Die leistungsfähigsten Kopplungsverfahren, die gerade in jüngster Zeit eine stetig wachsende Bedeutung erlangen, sind Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) und Electrospray Ionisation (ESI). Hier ist die Empfindlichkeit im Vergleich zu bewährten Techniken wie Thermospray Ionisation deutlich erhöht (Joos, 1995). Bei beiden Techniken steht das Interface unter Atmosphärendruck. Die Ionen werden unter Normaldruck generiert und über ein Transfer- und Fokussierungssystem in das Vakuumsystem des Massenspektrometers geleitet. Beide Verfahren zählen zu den sanften Ionisierungstechniken, d.h. der Analyt wird durch die Ionisierung thermisch nur minimal belastet. Dadurch gelangen die Substanzen im allgemeinen ohne zu fragmentieren in das Massenspektrometer und ihre Molekülmasse kann direkt bestimmt werden. Es wird ein Esquire-LC der Firma Bruker

verwendet. Das Interface ist für beide Ionisierungstechniken bei diesem Gerät sehr ähnlich aufgebaut und soll anhand des Electrospray Interfaces im folgenden verdeutlicht werden.

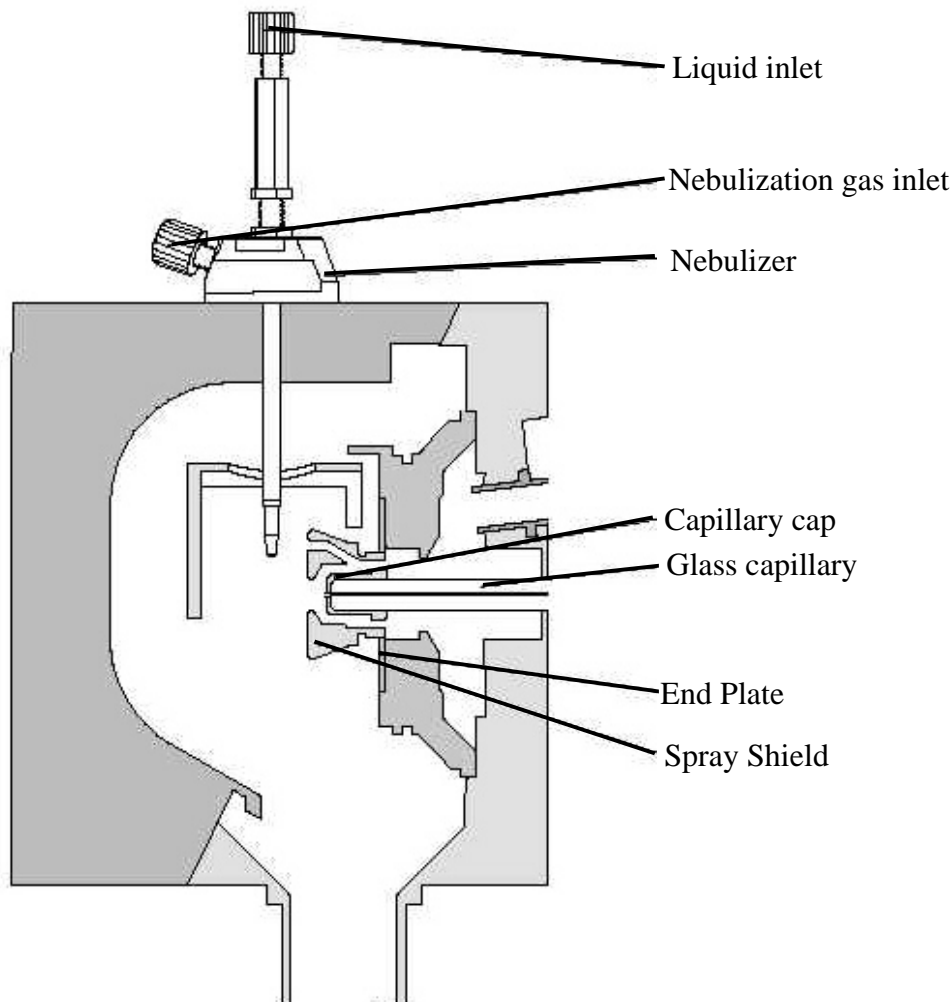


Abb. 27 Schematische Darstellung des ESI-Interfaces (Bruker, 1999)

Die Probe bzw. das Fließmittel der HPLC wird über einen Nebulizer in die Spraykammer eingeführt. Dieser Nebulizer steht im rechten Winkel zur Glaskapillare, dem Einlaß zum Massenspektrometer. Dies soll eine Belastung des Hochvakuum im Massenspektrometer durch eindringendes Lösungsmittel sowie nicht ionisierbare Substanzen verhindern, die bei dieser Anordnung nicht bzw. nur minimal in das Massenspektrometer gelangen. Die Probe tritt über eine Nadel im Nebulizer in die Spraykammer ein. Die Nadel ist von einer Röhre umgeben durch die das Nebulizergas (im allgemeinen Stickstoff) dem Fließmittel zugeführt wird. Dieses Gas ist entscheidend für die Ausbildung eines guten Sprays und für eine stabile Ionenausbeute. Zum Verdampfen des Lösungsmittels wird das Interface auf ca. 300°C geheizt

und zusätzlich ein Drying Gas (ebenfalls Stickstoff) in das Interface eingeblasen. Das Gas wird auf Temperaturen zwischen 120-365°C erhitzt und mit Flußraten zwischen 1-12 L/min dem Spray entgegen in die Spraykammer geblasen. Die Einstellungen richten sich nach den verwendeten HPLC-Flußraten. Durch die Anordnung des Drying Gas Heaters hinter dem Kapillareingang umspült das Drying Gas gleichzeitig die Kapillare und heizt sie auf. Über die Kombination von Spray, Drying Gas und Aufheizen des Interfaces verdampft das Fließmittel. Durch die einsetzende Coulomb-Explosion werden gasförmige Substanzen erzeugt, die über das Transport- und Fokussierungssystem in das Massenspektrometer gelangen. APCI ist die Technik der Wahl, wenn schwer ionisierbare Substanzen analysiert werden sollen. Bei dieser Technik wird das Fließmittel der HPLC pneumatisch fein vernebelt, durch eine auf 300°C erhitzte Kammer geleitet und vollständig verdampft. Die Ionisierung des so gebildeten Gas/Dampf-Gemisches erfolgt über eine im Interface befindliche Corona Nadel. Durch eine Corona-Entladung wird das Spray ionisiert. Die primär gebildeten Gasionen induzieren über chemische Ionisation die Bildung der gasförmigen Substanzen, die entsprechen dem ESI-Interface in das Massenspektrometer gelangen.

Als massensensitiver Detektor wird eine Ionenfalle verwendet. Diese ermöglicht Multistage-MS, d.h. durch Isolierung einzelner Molekülmassen in der Ionenfalle können diese erneut massenspektrometrisch analysiert werden. Es werden MS/MS-Spektren erhalten, die für die analysierte Substanz unter den angelegten massenspektrometrischen Bedingungen charakteristisch sind und entscheidende Hinweise zu ihrer Struktur geben. Die im Interface generierten Ionen gelangen über die Glaskapillare in das Transport- und Fokussiersystem des Massenspektrometers. Die metallischen Enden der Kapillare liegen auf Potential: im positiven Mode zwischen -2 bis -6 kV relativ zur Nebulizernadel und -500 V relativ zur End Plate. Der so erzeugte elektrostatische Gradient unterstützt die Bildung geladener Gasionen und ihren Transport zum Kapillareinlaß. Je nach Polarität der an der Kapillare angelegten Spannung werden entweder positive oder negative Ionen aus dem Interface angezogen und durch den Druckgradient zwischen Spraykammer (ca. 1013 mbar) und erster Vakuumstufe (2 mbar) weitergeleitet. Die folgenden Skimmer entfernen den Großteil des Drying Gas. Anschließend passieren die Ionen den Oktapol. Dieser hat hier lediglich Transportfunktion (also keine Trennfunktion) und transportiert die Ionen vom relativ hohen Druckbereich der Skimmer zum Niederdruckbereich der Fokussierungs- und Ausgangslinsen, die den Iontentransportbereich mit der Ionenfalle, dem eigentlichen Massenanalysator, verbinden.

2.1.4.1.2 Methodenentwicklung

Für die Trennung der Diketopiperazine wird eine Nucleosil C18 HD Säule von Macherey-Nagel mit Vorsäule aus gleichem Material verwendet. Um eine Trennung der in ihrer Hydrophobizität sehr ähnlichen Isomere der einzelnen Diketopiperazine zu erreichen, gleichzeitig aber auch die stark hydrophoben Diketopiperazine cyclo(Pro-Leu), cyclo(Pro-Ile) und cyclo(Pro-Phe) in akzeptablen Retentionszeiten von der HPLC-Säule zu eluieren, wird wie schon beim Nachweis der Diketopiperazine ein Gradient verwendet. Im Gegensatz zur qualitativen Screening-Methode wird mit 2%iger Essigsäure und Methanol als organischem Lösungsmittel gearbeitet. Methanol bietet verglichen mit Ethanol den Vorteil, wesentlich preisgünstiger zu sein und stellt durch seine niedrigere Viskosität geringere Anforderungen an die Stabilität des Systems, da entsprechend niedrigere Drücke resultieren. Im Gegensatz zum qualitativen Screening wird keine sensorische Verkostung der eluierenden Substanzen durchgeführt, sodaß die Verwendung von Methanol hier auch aus toxikologischer Sicht unbedenklich ist.

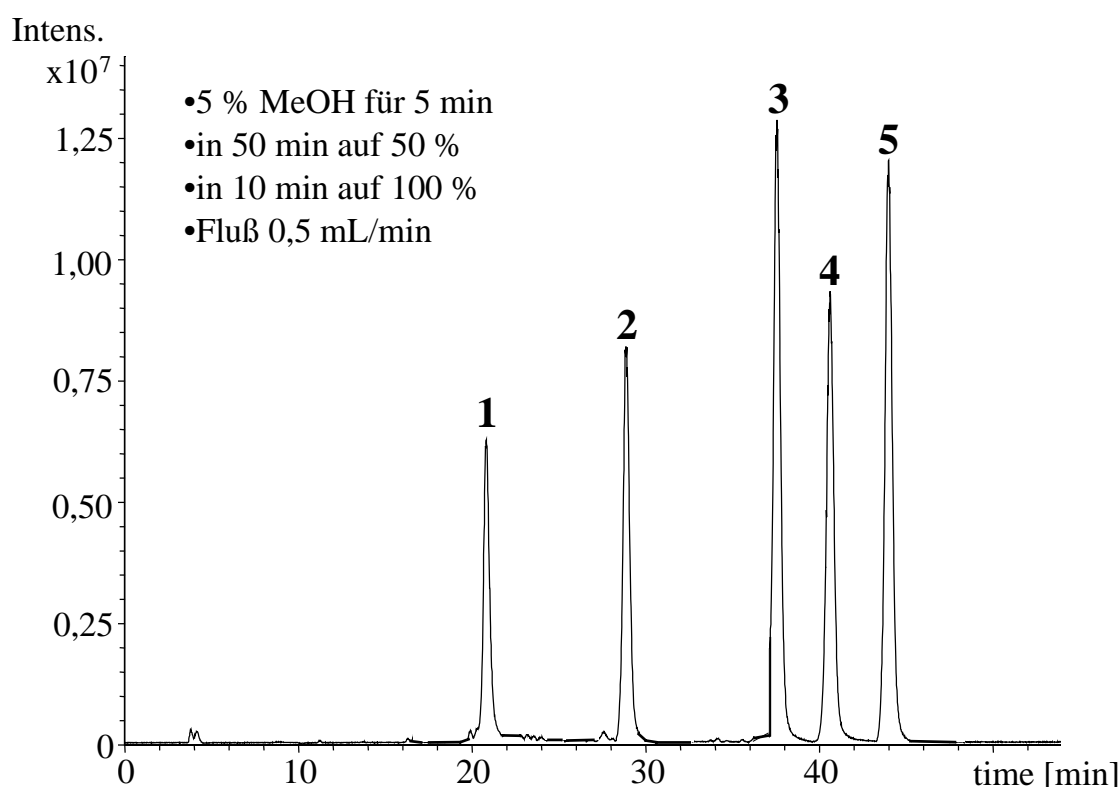


Abb. 28 Diketopiperazin-Mischstandard, Trennung der synthetisierten cis-Diketopiperazine mit Methanol/Essigsäure-Gradient. Cis-cyclo(Pro-Pro) (1), cis-cyclo(Pro-Val) (2), cis-cyclo(Pro-Ile) (3), cis-cyclo(Pro-Leu) (4) und cis-cyclo(Pro-Phe) (5)

Getestet werden verschiedene Gradientenverläufe und HPLC-Bedingungen, um eine optimale Trennung aller quantitativ zu bestimmenden Diketopiperazine zu erreichen. Unter allen getesteten Gradienten erweist sich der in Abb. 28 dargestellte für die Trennung als optimal. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, werden alle Diketopiperazine grundliniengetrent, ergeben scharfe Signale in der Masse und die Analysen sind vertretbar schnell.

Neben den HPLC-Trennbedingungen sind bei einer Quantifizierung von Substanzen mittels Massenspektrometrie ferner die MS-Parameter zu optimieren, um eine möglichst empfindliche und reproduzierbare Detektion zu erreichen. Bereits bei der Identifizierung der Diketopiperazine hatte sich der positive ESI-Mode als ideal zur Bestimmung von stickstoffhaltigen Substanzen wie den Diketopiperazinen gezeigt (siehe 2.1.2). In diesem Mode ermöglicht das verwendete Bruker Esquire generell zwei mögliche Meß-Varianten: den MS-Mode, oder die Aufnahme von MS/MS-Spektren der einzelnen zu erwartenden Ionenspuren, in diesem Fall der Massen 195 m/z für cyclo(Pro-Pro), 197 m/z für

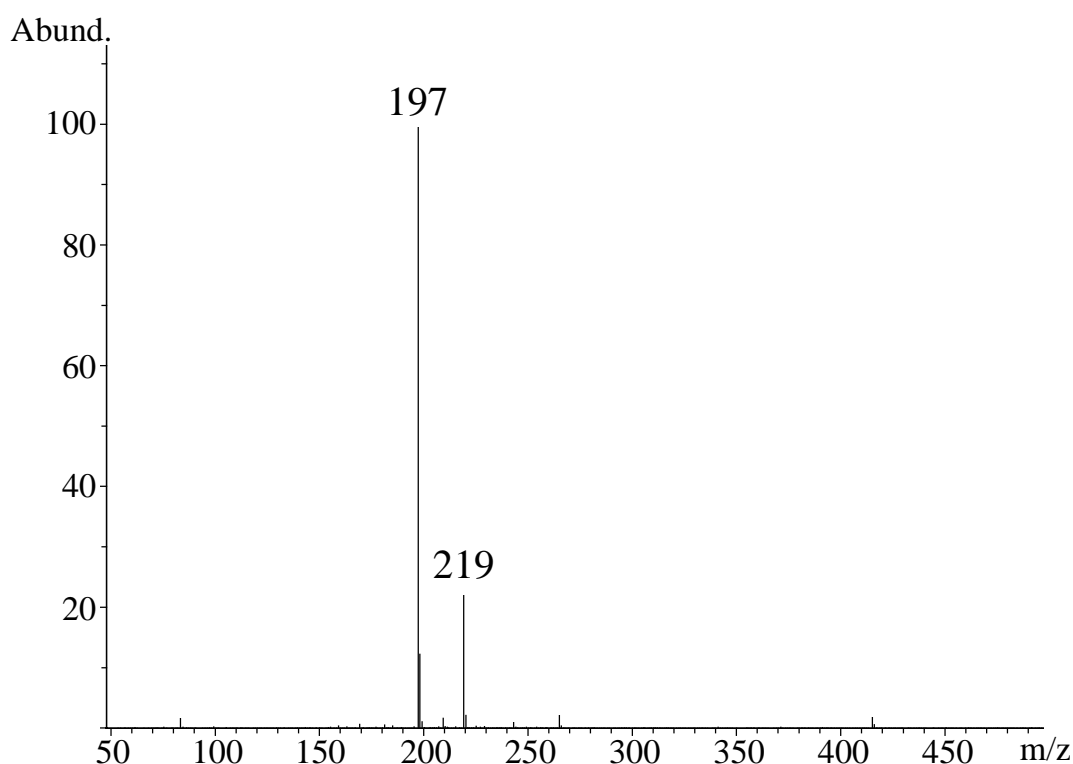


Abb. 29 MS-Spektrum der cis-cyclo(Pro-Val) Referenz bei den gewählten Interface- und MS-Einstellungen

cyclo(Pro-Val), usw. Im ersten Fall wird über das Massensignal, z.B. im Falle von cyclo(Pro-Pro) über die Massenspur 195 m/z quantifiziert; im zweiten Fall über die charakteristischen Fragmente, die sich im MS/MS der Masse 195 m/z für cyclo(Pro-Pro) bzw. den anderen Molekülmassen ergeben. Beide Meßmethoden haben Vor- und Nachteile. Im MS-Mode werden die Massenspuren der zu bestimmenden Substanzen aufgenommen. Der Detektor erfaßt dabei einen bestimmten Massenbereich und reichert die Ionen dieser Massen unspezifisch an, was in einem höheren Grundrauschen resultiert. Im MS/MS-Mode wird die Ionenfalle so angesteuert, daß ausschließlich die Molekülmasse in der Falle angereichert wird, von der ein MS/MS-Spektrum aufgenommen werden soll, z.B. 195 m/z für cyclo(Pro-Pro). Diese wird dann fragmentiert und die Intensität der Fragmente erfaßt. Bruker empfiehlt diese Methode für die Quantifizierung mit dem Bruker Esquire, da sie selektiv arbeitet und sehr empfindlich sein soll. Hier wurde exakt der gegenteilige Effekt beobachtet. Im MS-Mode zeigte sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei gleicher DKP-Konzentration und ansonsten identischen Einstellungen deutlich besser als im MS/MS-Mode, die Substanzen werden also im MS-Mode wesentlich sensibler erfaßt. Daher erfolgt die Quantifizierung der DKPs im MS-Mode über einen Scan-Bereich von 50-500 Masseneinheiten.

Neben der Wahl des MS-Modes sind die Methodenparameter, d.h. die Einstellung des Interface und des Massenspektrometers selber auf die zu analysierenden Verbindungen abzustimmen. Wird das Interface mit zu niedrigen Einstellungen, also Temperatur, Gasfluß und Spannungen gefahren, ist die Ionenausbeute und damit die Empfindlichkeit der Methode schlecht; sind die Einstellungen zu drastisch, so fragmentieren die Substanzen bereits im Interface und werden dann bei der Quantifizierung nicht mehr erfaßt, was sich ebenfalls durch sinkende Empfindlichkeit zeigt. In Abb. 29 ist das MS-Spektrum der cis-cyclo(Pro-Val) Referenz bei den verwendeten Interface- und Massenspektrometer-Einstellungen abgebildet. Bei diesen Einstellungen wird nahezu ausschließlich das Molekülion generiert. Das Molekül fragmentiert nicht und auch die Intensität des Natrium-Adduktes ist minimal.

2.1.4.1.3 Kalibrierung und Reproduzierbarkeit

Nach Optimierung der Methoden- und Meßparameter ist die Linearität der Methode zu überprüfen; dies erfolgt durch Aufnahme von Kalibrierreihen aller cis-konfigurierten Diketopiperazine. Die Auswertung erfolgt über die Peakflächen. Es wird davon ausgegangen, daß die trans-konfigurierten DKPs sich in Bezug auf die Detektion mittels MS identisch ihren cis-Isomeren verhalten. Die Quantifizierung der Isomere eines Diketopiperazins erfolgt daher

über dieselbe Kalibrierung. Die Linearität der Methode wird für alle Diketopiperazine über einen Konzentrationsbereich von 0,001 mg/mL bis 0,1 mg/mL bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt. Alle zu untersuchenden Diketopiperazine zeigen sich über einen Konzentrationsbereich von zwei Zehner-Potenzen linear mit Korrelationen zwischen 0,98 bis 0,99. Bei Konzentrationen über 0,1 mg/mL endet die Linearität und es zeigt sich ein abflachender Kurvenverlauf. Hier sind die Konzentrationen für eine reproduzierbare Anreicherung in der Falle zu hoch. Unter 0,001 mg/mL ist das System zwar weiter linear, kommt aber je nach Diketopiperazin mehr oder weniger schnell in ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis kleiner 5:1. In dem angegebenen Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,1 mg/mL ist die Linearität der Methode gegeben und für die Quantifizierung geeignet.

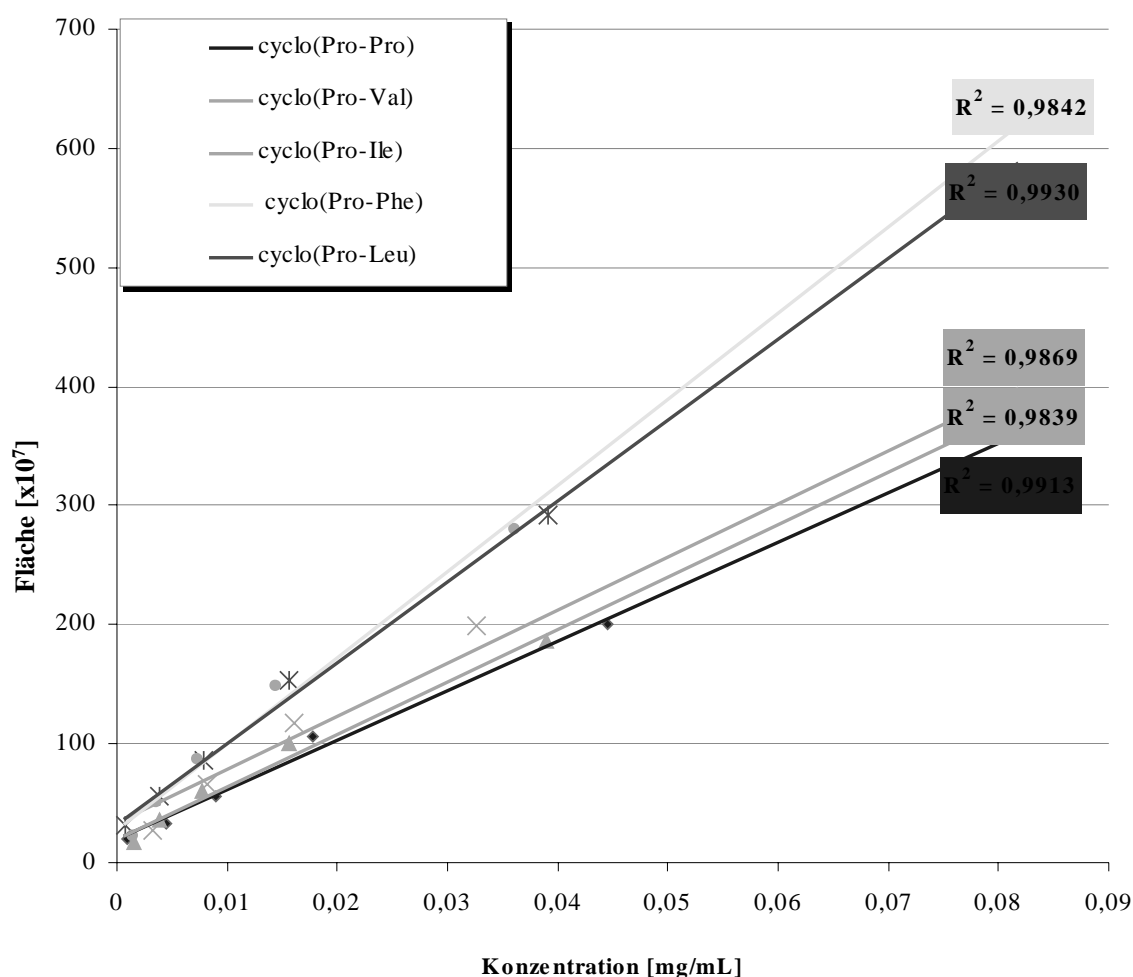


Abb. 30 Korrelationsgeraden der fünf cis-Diketopiperazine

Im Gegensatz zu einer Detektion von Substanzen über UV oder auch mittels Quadrupol-Massenspektrometer ist das Ionensignal der Ionenfalle von einer weit größeren Zahl an Variablen abhängig und daher weniger stabil. Durch Veränderung der Sprayer-Justierung im ESI-Interface (siehe 2.1.4.1.1.) kann sich das generierte Spray ändern und so die Ionenausbeute in der Ionenfalle und damit die Empfindlichkeit verringern. Matrix- und Substanzreste, die nicht ionisiert wurden, belegen das Interface, vor allem das Spray Shield und beeinflussen so das angelegte elektrische Feld und die resultierende Saugspannung zwischen Capillary und Sprayer, was in einer Verringerung der Ionenausbeute resultieren kann. Auch der Umbau von ESI- auf APCI-Interface kann eine Veränderung der Empfindlichkeit mit sich bringen. Um den Einfluß dieser und weiterer Parameter zu untersuchen, wird die Reproduzierbarkeit der Methode getestet. Es werden Diketopiperazin-Mischstandards unterschiedlicher Konzentration an verschiedenen Tagen, vor und nach Umbau und Reinigung des Interfaces wiederholt vermessen. Sowohl die HPLC in Bezug auf Retentionszeiten, als auch die Flächen der Diketopiperazin-Signale, zeigen sich bei wiederholter Analyse sehr reproduzierbar (siehe Anhang VII). Die Gültigkeit der durchgeführten Kalibrierung als auch die Reproduzierbarkeit wird durch regelmäßige Kontrolle mit Diketopiperazin-Mischstandards überprüft.

2.1.4.1.4 Probenaufarbeitung

Um die Diketopiperazine in Röstkaffee quantifizieren zu können, ist ihre Anreicherung aus der Kaffeematrix unumgänglich. Problematisch ist vor allem die Abtrennung des Coffeins. Diese ist aber nötig, da Coffein eine reproduzierbare Analytik nachfolgend eluierender Substanzen infolge der empfindlichen Detektion erschwert (siehe 2.1.3.3). Herkömmliche Verfahren zur Entcoffeinierung, vor allem die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan, bringen nicht den gewünschten Effekt. Die Diketopiperazine lösen sich wie Coffein ausgezeichnet in diesen Lösungsmitteln. Die Extraktion ist demzufolge zur Coffein-Abtrennung ungeeignet, bietet sich aber zur Aufkonzentrierung der Diketopiperazine aus der Kaffeematrix an, da ein Großteil der eher polaren Inhaltsstoffe des Kaffeegetränks wie Chlorogensäuren usw. abgetrennt werden können. Verschiedene Techniken wie Festphasen-Extraktion oder Gelchromatographie wurden zur Coffein-Abtrennung getestet, zeigten aber keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Weidner (1999) analysierte die Alkaloidzusammensetzung verschiedener Kaffee-Varietäten zur Sortencharakterisierung, vor allem zur Unterscheidung zwischen *Coffea Arabica* und *Coffea Canephora* var. *Robusta*. Zur

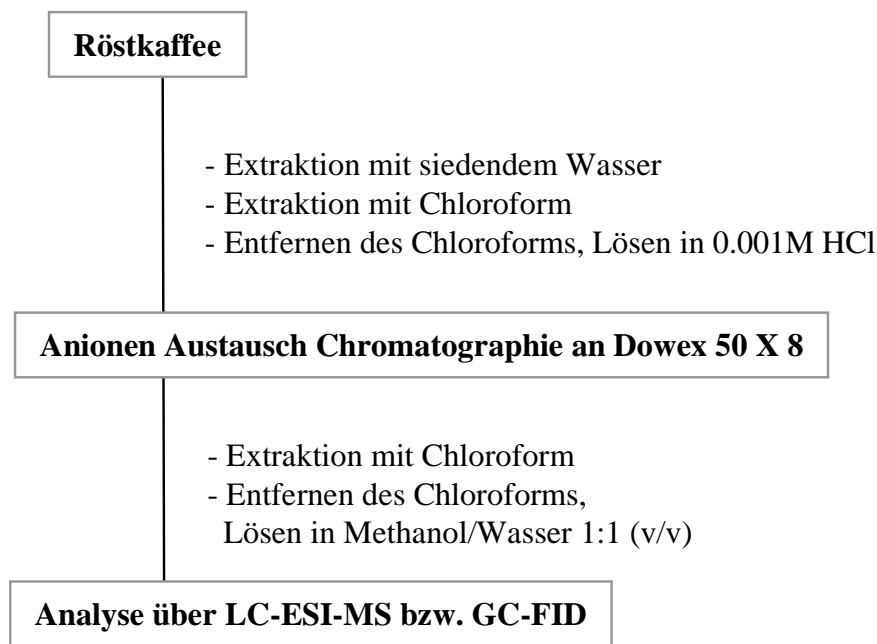


Abb. 31 Kaffee-Aufarbeitung zur DKP-Quantifizierung

Entcoffeinierung der untersuchten Kaffees arbeitet Weidner mit dem Anionenaustauscher Dowex 50X8 bei $\text{pH} = 3,0$. Der Austauscher wird mit 0,1 molarer Salzsäure konditioniert und anschließend mit 0,001 molarer Salzsäure gespült. Nach Weidner (1999) kommt es sowohl zur Ausbildung ionischer Wechselwirkungen als auch zu Adsorption der Alkaloide an das Austauscherharz. Die Verwendung dieses Anionenaustauschers zeigt sich für die Abtrennung des Coffeins von den Diketopiperazinen gut geeignet. Während Coffein am Austauscher fixiert wird, tritt mit den zu analysierenden Diketopiperazinen keine Wechselwirkung auf. In Abb. 31 ist die verwendete Probenaufarbeitung dargestellt. Die Kaffees werden nach dem dargestellten Schema aufgearbeitet und direkt mit der entwickelten LC-ESI-MS Methode analysiert.

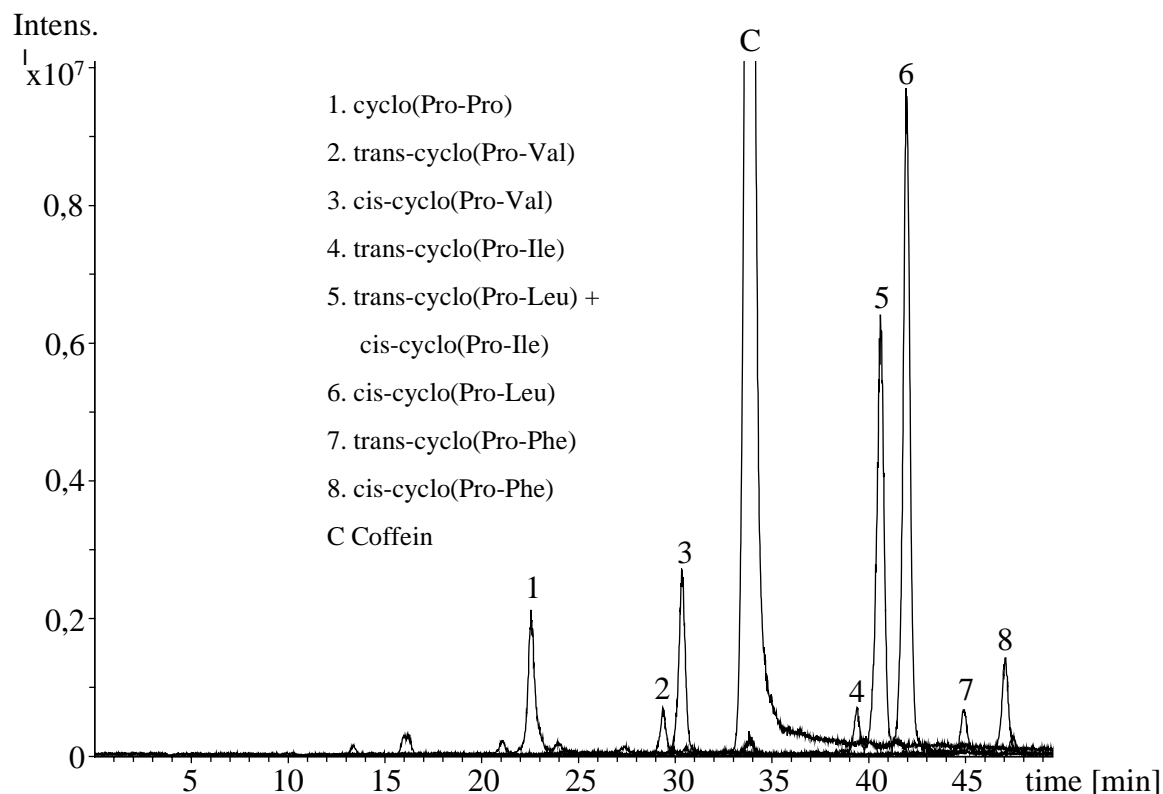


Abb. 32 Massenspuren und Totalionenstrom des aufgearbeiteten Brazil Arabica.

In Abb. 32 ist der Totalionenstrom eines aufgearbeiteten Brazil Arabicas dargestellt. Mit Hilfe der Probenaufarbeitung können die Diketopiperazine im Röstkaffee angereichert und Coffein weitgehend abgetrennt werden.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde ein Handelskaffee mit und ohne Zusatz an synthetisierten Diketopiperazinen aufgearbeitet und die Diketopiperazine quantifiziert. Die zugesetzte Diketopiperazin-Menge entsprach den analytisch ermittelten Gehalten im Röstkaffee. Die Wiederfindungsraten für die fünf Diketopiperazine liegen zwischen 93-98 %. Die Reproduzierbarkeit der Methode bei den analysierten Kaffees wurde über die wiederholte Analyse eines Handelskaffees bestimmt. Der Kaffee wurde zehnmal aufgearbeitet und die Standardabweichung und der Variationskoeffizient für die einzelnen Diketopiperazine berechnet. Die Daten sind im Anhang VII zusammengestellt. Die Variationskoeffizienten liegen je nach Diketopiperazin zwischen 2,1-6,2 %.

2.1.4.1.5 Diketopiperazin-Gehalte in Handelskaffees und Espresso

Es werden vier Handelskaffees verschiedener Anbieter untersucht, sowie ein entcoffeinierter Kaffee und zwei Espressos. Die Kaffees werden doppelt aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt (Daten siehe Anhang VIII).

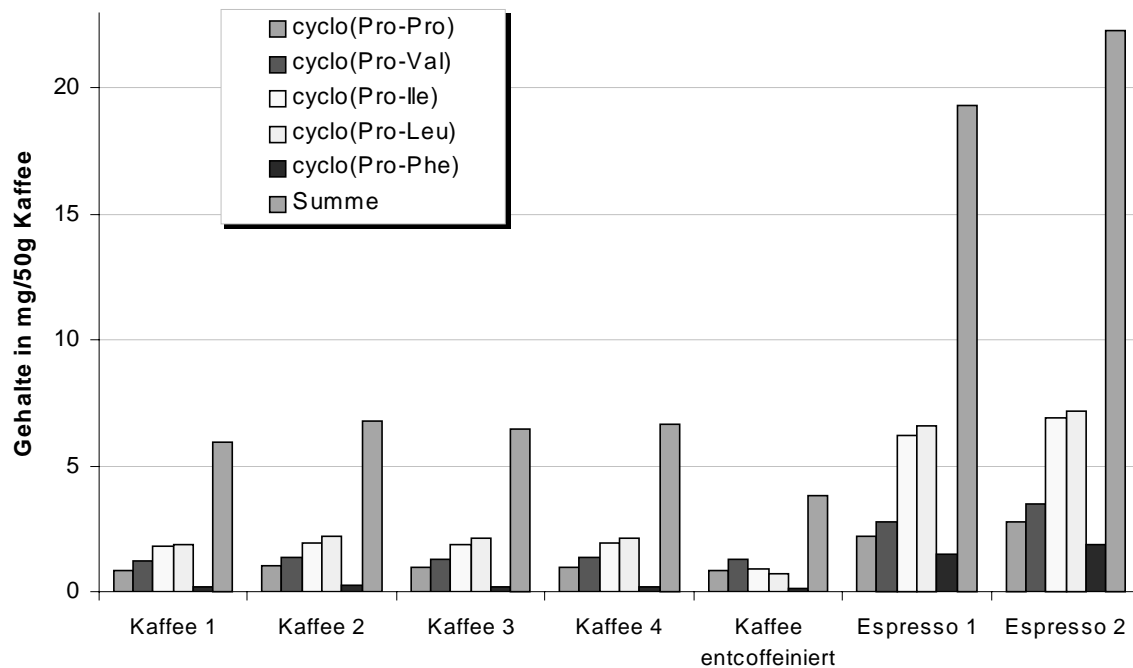


Abb. 33 Diketopiperazin-Gehalte in den analysierten Kaffees

Die vier Handelskaffees zeigen geringe Unterschiede in den Diketopiperazin-Gehalten. Unabhängig vom untersuchten Röstkaffee liegen die Gehalte in der Summe um 5-7 mg/50g Röstkaffee. 50 g Röstkaffee wird hier als die Menge angenommen, die durchschnittlich für die Bereitung eines Liters Kaffees verwendet wird. Demzufolge macht es für die Diketopiperazin-Gehalte kaum einen Unterschied, welche Art von Kaffee-Provenienz verwendet wird bzw. in welchen Verhältnissen die einzelnen Provenienzen gemischt werden. Wie unter 2.1.2 dargelegt, erfolgt die Bildung der Diketopiperazine aus Rohkaffee-Proteinen während der Röstung. Da Unterschiede in Bezug auf die Proteingehalte wie auch die Aminosäurezusammensetzung zwischen den einzelnen Kaffee-Varietäten nur marginal sind, ist das Ergebnis nicht weiter verwunderlich.

Im Vergleich finden sich im entcoffeynierten Kaffee niedrigere Gehalte als in den Handelskaffees, während die beiden Espressos höhere Gehalte aufweisen. Da für Espresso und auch entcoffeynierten Kaffee die gleichen Kaffee-Provenienzen verwendet werden wie für die Handelskaffees, erklären sich die verschiedenen Gehalte über den unterschiedlichen Röstgrad. Espresso-Kaffees werden im Verhältnis zu Handelskaffees unter härteren Röstbedingungen geröstet, was in einem höheren organischen Röstverlust und einer dunkleren Röstfarbe resultiert. Längere Röstzeiten bzw. höhere Rösttemperaturen bedingen auch eine verstärkte thermische Belastung des Kaffees. Da der Abbau der Rohkaffee-Proteine während des Röstprozesses zunimmt, ist mit einer stärkeren Proteindegradation in hochgerösteten Kaffees wie einem Espresso zu rechnen und damit mit höheren Gehalten an Diketopiperazinen. Im Gegensatz dazu sind die niedrigeren Diketopiperazin-Gehalte in entcoffeyniertem Kaffee zuerst einmal überraschend. Entcoffeyniertem Kaffee wird vor der Röstung durch organische Lösungsmittel oder Extraktion mit überkritischem CO₂ das Coffein größtenteils entzogen. Prozentual steigt damit der Gehalt an Proteinen im Rohkaffee und es sollte im gerösteten Kaffee ein höherer Gehalt an Diketopiperazinen entstehen. Entcoffeynierter Kaffee wird im Vergleich zu herkömmlichem Kaffee allerdings bei milderer Bedingungen geröstet. Bei einem milder gerösteten Kaffee ist mit geringeren Gehalten an Diketopiperazinen zu rechnen.

Die Übereinstimmung zwischen den einzelnen Kaffees besteht nicht nur in der DKP-Summe, sondern auch in der Verteilung der einzelnen Diketopiperazine im Röstkaffee: cyclo(Pro-Leu) und cyclo(Pro-Ile) bilden die Hauptverbindungen, gefolgt von cyclo(Pro-Val) und cyclo(Pro-Pro). Die Gehalte von cyclo(Pro-Phe) sind von allen analysierten Diketopiperazinen am geringsten. Wie schon beim qualitativen Nachweis finden sich auch in den Handelskaffees beide möglichen Diketopiperazin-Isomere, wobei die Gehalte der trans-Isomere kleiner als die der cis-Isomere sind. Setzt man diese Ergebnisse in Bezug zu den Aminosäuregehalten in Rohkaffee nach Totalhydrolyse (siehe 2.1.1.2), findet sich Prolin mit 6,65 %, Leucin mit 8,77 %, Isoleucin mit 4,60 %, Valin mit 8,05 % und Phenylalanin mit 5,80 % (Daten eines Columbia Arabica nach Thaler und Gaigl, 1963). Legt man diese Gehalte in den Rohkaffee-Proteinen zugrunde, zeigt sich kein direkter Zusammenhang zwischen den einzelnen Diketopiperazin- und den Aminosäuregehalten. Neben den Gehalten der zugrundeliegenden Aminosäuren spielt demzufolge wohl die Position der Aminosäuren in der Protein-Primärstruktur eine entscheidende Rolle. Geht man von dem postulierten Bildungsmechanismus nach Rizzi (1989) aus, so müssen die diketopiperazinbildenden

Aminosäuren im Peptidstrang bereits in direkter Nachbarschaft liegen und dann intramolekular cyclisieren (siehe 2.1.2.2.1). Entscheidend wäre daher das Verhältnis der vier mit Prolin diketopiperazinbildenden Aminosäuren in direkter Nachbarschaft in der Peptidkette zu Prolin. Leider ist über die Position der Aminosäuren in der Peptidkette der Rohkaffee-Proteine nichts bekannt und somit kann kein direkter Zusammenhang zwischen den Gehalten der prolin-haltigen Diketopiperazine und den Aminosäuregehalten im Rohkaffee gezogen werden.

Interessant ist ferner das unterschiedliche Verhältnis der Diketopiperazin-Isomere bei den untersuchten Kaffees. Während in den analysierten Handelskaffees die cis-Isomere überwiegen, ist das Verhältnis in den analysierten Espressos zu den trans-Isomeren hin verschoben.

2.1.4.1.6 Entwicklung der Diketopiperazine mit zunehmendem Röstgrad

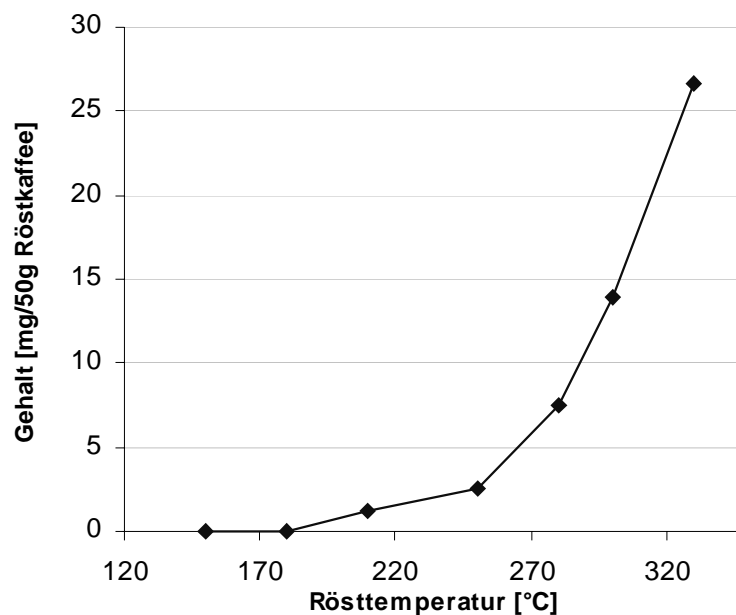


Abb. 34 Entwicklung der Diketopiperazine während der Röstung;
Summe der quantifizierten Diketopiperazine

Um die Entwicklung der Diketopiperazin-Isomere mit zunehmender Röstung zu beobachten, wird eine Röstserie des Brazil Arabica mittels eines Laborrösters hergestellt und analysiert. Bei dem Röster handelt es sich um einen dem Aerotherm-Prinzip der Firma Heimbs nachempfundenen Gebläse-Röster. Es wird eine Röstserie von 150°C bis 330°C Rösttemperatur bei konstanter Röstdauer von 3 min produziert und über LC-ESI-MS analysiert (siehe Anhang IX). Wie die Ergebnisse der Handelskaffee- und Espresso-Proben schon hatten vermuten lassen, ist eine signifikante Zunahme der Diketopiperazine mit zunehmendem Röstgrad zu erkennen (siehe Abb. 34). Die Daten belegen die bereits vermutete Bildung der Diketopiperazine durch thermischen Abbau von Rohkaffee-Prekursoren, nach den unter 2.1.2 dargelegten Ergebnissen vornehmlich Proteine. Während im Rohkaffee und auch in den niedrig gerösteten Kaffees keine Diketopiperazine nachgewiesen werden konnten, steigt ihr Gehalt während der Röstung rapide an. Diese Entwicklung deckt sich mit dem Abbau der Rohkaffee-Proteine, die infolge ihrer Stabilität zu Beginn der Röstung keine großen Veränderungen erfahren, dann aber verstärkt reagieren und Diketopiperazine bilden. Die starke Zunahme gerade im hohen Rösttemperaturbereich und die Tatsache, daß ein Abflachen der Kurve nicht zu erkennen ist, deuten daraufhin, daß bei

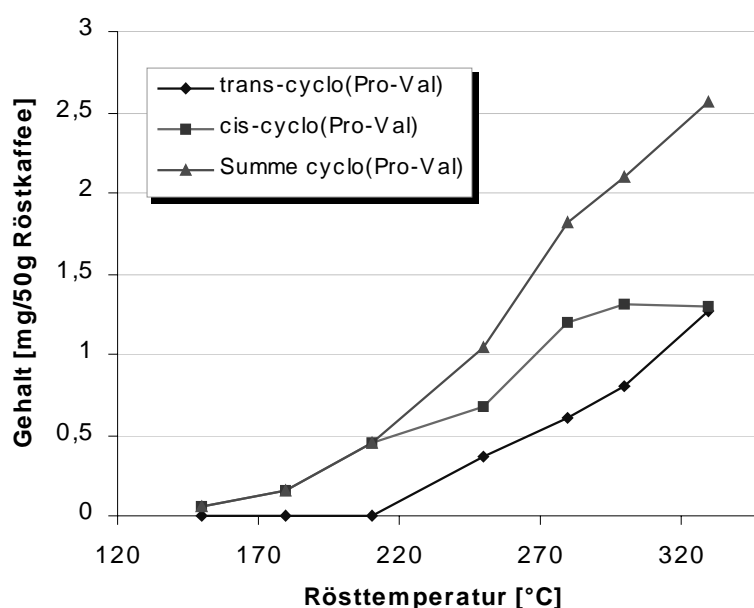


Abb. 35 Entwicklung der cyclo(Pro-Val) Isomere während der Röstung

intensiverer Röstung noch höhere Gehalte an Diketopiperazinen gebildet würden und daß die Substanzen den Röstprozeß unbeschadet überdauern. Diese hier in der Summe dargestellte Entwicklung zeigt sich auch bei Betrachtung der einzelnen Diketopiperazine.

Wie in Abbildung 35 für die Isomere von cyclo(Pro-Val) dargestellt, verhalten sich alle analysierten Diketopiperazine im Verlauf der Röstung. Interessant ist hier vor allem die Entwicklung der einzelnen Isomere. Augenscheinlich kommt es zuerst zur Bildung des cis-Isomers, und erst im weiteren Verlauf setzt die Bildung des trans-Isomers ein. Diese Entwicklung deckt sich mit dem postulierten Bildungsmechanismus nach Rizzi (1989) und den bisherigen Erkenntnissen. Ein Bruch des Peptidstranges und intramolekulare Cyclisierung führt ausschließlich zur Bildung des cis-Isomers. Rizzi vermutet eine Umlagerung des cis- in das trans-Isomer, während oder nach der Cyclisierung, was durch die quantitativen Daten bestätigt wird. Bei höheren Röstgraden ist eine Sättigung des cis-Isomerengehalts zu erkennen, während die Gesamtsumme bedingt durch den steigenden trans-Isomerengehalt weiter stark zunimmt. Diese Entwicklung läßt sich durch eine Umlagerung des zuerst gebildeten cis-Isomers in das thermisch stabilere trans-Isomer erklären. Da sich diese Tendenz bei allen Diketopiperazinen abzeichnet, scheint es sich um einen generellen Bildungsweg zu handeln.

2.1.4.2 Quantifizierung mittels GC-FID

GC-FID wurde von anderen Autoren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Diketopiperazinen eingesetzt (Pickenhagen et al., 1975; Rizzi, 1989) und daher hier als Alternativ-Methode zur LC-ESI-MS verwendet.

2.1.4.2.1 Methodenentwicklung

Da nicht davon ausgegangen werden kann, daß nicht auch andere bisher nicht identifizierte Diketopiperazine in Röstkaffee vorhanden sind, wird Myristinsäuremethylester als interner Standard verwendet. Die Substanz ist unzersetzt verdampfbar und läßt sich unter den verwendeten GC-Bedingungen ausreichend von den Diketopiperazinen abtrennen. Durch Optimierung des Temperaturprogramms und der weiteren Trennbedingungen wird die in Abb. 36 dargestellte Trennung erreicht. Schwierig zeigt sich die Trennung von cyclo(Pro-Pro) sowie der cyclo(Pro-Leu)- und cyclo(Pro-Ile)-Isomere, während cyclo(Pro-Val) und cyclo(Pro-Phe) gut abgetrennt werden. Cyclo(Pro-Ile), cyclo(Pro-Leu) und cyclo(Pro-Pro)

hingegen eluieren sehr dicht nacheinander und bilden eine Gruppe von fünf Signalen. Eine Grundlinientrennung konnte nicht erreicht werden. Die Methode ist von ihrer Trennleistung im Vergleich zu der unter 2.1.4.1 beschriebenen LC-ESI-MS Methode dementsprechend weniger leistungsstark. Da mit der LC-ESI-MS eine reproduzierbar gute Methode zur Diketopiperazin-Quantifizierung zur Verfügung stand, wurde hier auf eine weitere Methodenoptimierung verzichtet und die Methode lediglich zur Absicherung der quantitativen Daten herangezogen. Die Quantifizierung der Diketopiperazine im Röstkaffee kann über die gleiche Probenaufarbeitung erfolgen, wie sie schon für die LC-ESI-MS Analysen verwendet wurde (siehe 2.1.4.1.4).

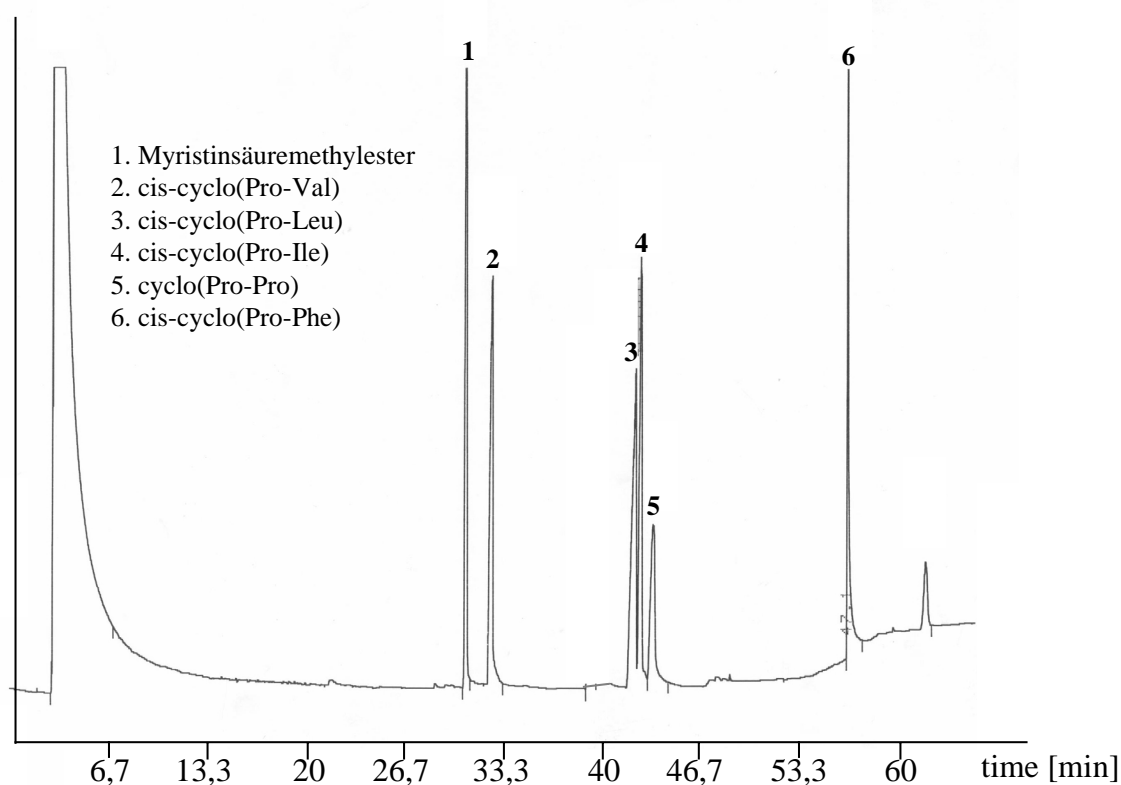


Abb. 36 GC-FID Chromatogramm eines Diketopiperazin-Mischstandards + Myristinsäuremethylester

2.1.4.2.2 Methodenparameter

Die Response-Faktoren der Diketopiperazine zu Myristinsäuremethylester werden bei verschiedenen Verhältnissen bestimmt und zeigen sich über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich konstant. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Methode werden Mischstandards und Kaffeeproben in regelmäßigen Abständen wiederholt injiziert. Es zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen (Daten siehe Anhang X).

2.1.4.2.3 Quantifizierung in Handelskaffees und der Röstserie

Die für die LC-ESI-MS Analyse aufgearbeiteten Kaffeeproben werden mit Myristinsäuremethylester versetzt und direkt für die GC-Analyse eingesetzt. Da eine Trennung der Isomere von cyclo(Pro-Leu) und cyclo(Pro-Ile) sowie cyclo(Pro-Pro) für eine Quantifizierung nicht ausreichend gelingt, können die Substanzen hier lediglich als Summenparameter quantifiziert werden. Die gefundenen Werte decken sich mit denen der LC-ESI-MS Quantifizierung (Daten siehe Anhang XI). Auch für die Röstserien finden sich die beobachteten signifikanten Zunahmen mit steigendem Röstgrad sowie die Verschiebung im Verhältnis der Isomerenpaare zugunsten des stabileren trans-Isomers.

2.1.5 Synthese von Diketopiperazinen

Da die benötigten Diketopiperazine bis auf cis-cyclo(Pro-Leu) käuflich nicht zu erwerben sind, werden sie auf zwei unterschiedlichen Wegen hergestellt: durch chemische Synthese und durch thermische Behandlung der zugrundeliegenden Aminosäuren. Diese beiden Wege werden gewählt, da die Referenz-Substanzen neben der Absicherung der Identifizierung und ihrer Quantifizierung vor allem auch zur sensorischen Bestimmung der Bitterkeits-Erkennungsschwellen herangezogen werden sollen. Aus toxikologischen Gründen und Vermeidung jeglicher gesundheitlicher Gefahren ist eine Verkostung der chemisch synthetisierten Substanzen nicht ohne aufwendige Aufreinigung möglich, sodaß nach einer zweiten Synthese-Variante gesucht wurde, die toxikologisch unbedenklich ist. Sie wurde mit der Röstung der den Diketopiperazinen zugrundeliegenden Aminosäuren gefunden.

2.1.5.1 Chemische Synthese von cis-Diketopiperazinen

Es werden elf Diketopiperazine als Referenz-Substanzen synthetisiert, die Phenylalanin bzw. Prolin enthalten (siehe Abb. 37).

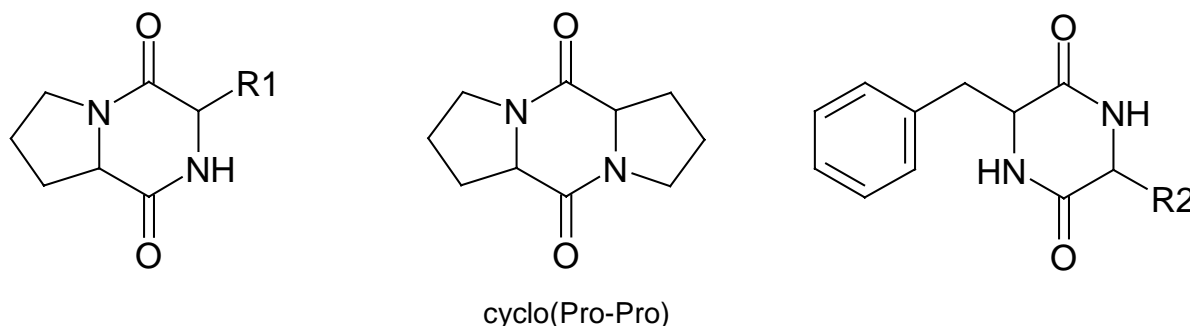


Abb. 37 Struktur der chemisch synthetisierten cis-Diketopiperazine
 R1 = L-Alanin, Glycin, L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Valin
 R2 = L-Alanin, L-Asparagin, L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Valin

Für die Synthese werden (*L*)-Aminosäuren eingesetzt, was nach Cahn-Ingold-Prelog der (*S*)-Konfiguration entspricht. Da es sich bei Diketopiperazinen um cyclische Dipetide handelt, gelten bei ihrer Synthese die allgemeinen Bedingungen der Peptidsynthese. Durch Kondensationsreaktion zweier Aminosäuren entsteht hierbei unter Ausbildung einer Peptidbindung zuerst ein Dipeptid. Die Schwierigkeit liegt hier in der Anwesenheit von je zwei Amino- bzw. Carboxylgruppen. Dementsprechend können bei der Reaktion von zwei α -Aminosäuren vier verschiedene Dipeptide entstehen und eine gezielte Synthese ist nicht ohne weiteres möglich. Durch vorübergehende Blockierung einer der beiden Aminogruppen und Überführung der reagierenden Carboxylgruppe in ein reaktives Derivat (z.B. als Säurechlorid) kann die Synthese jedoch gezielt durchgeführt werden, sodaß ausschließlich das gewünschte Dipeptid entsteht. An die Schutzgruppe ist die Bedingung zu stellen, daß sie unter milden Bedingungen, ohne das Molekül zu verändern, wieder abgespalten werden kann. Verschiedene Reagenzien können zum Schutz einer Aminofunktion eingesetzt werden. Häufig benutzte Schutzgruppen sind die *t*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Schutzgruppe) und die Benzyloxycarbonylgruppe (Z-Schutzgruppe), welche durch die Reagenzien *t*-Butyloxycarbonylazid bzw. Chlorameisensäurebenzylester eingeführt werden können (Habermehl und Hammann, 1992; Hauptmann, 1985). Im Anschluß an die Synthese des Dipeptides wird durch intramolekulare Kondensationsreaktion das entsprechende cyclische

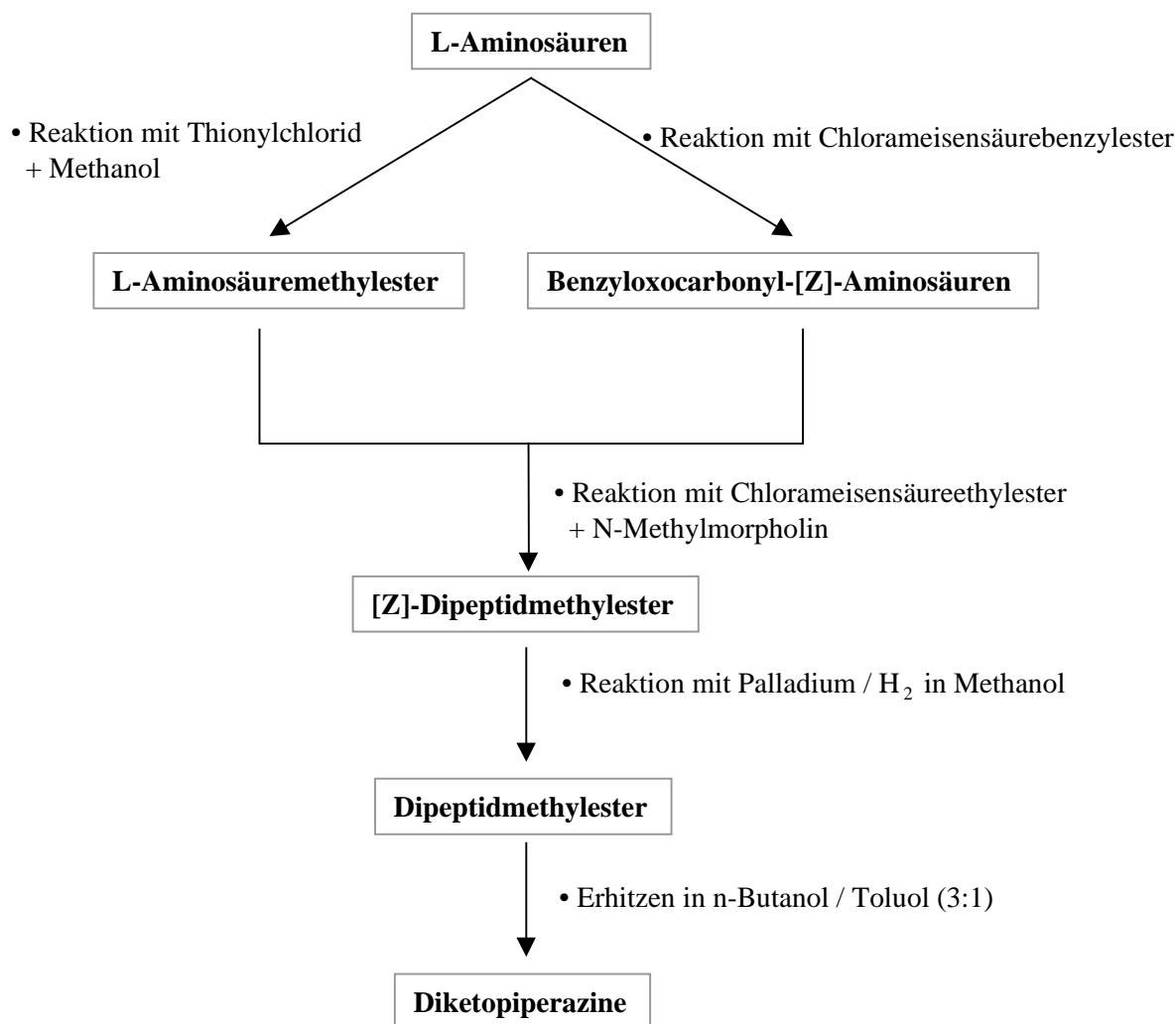


Abb. 38 Schema der Diketopiperazin-Synthese

Anhydrid (2,5-Diketopiperazin) gebildet (Beyer und Walter, 1991). Die durchgeführte Synthese ist in Abb. 38 schematisch wiedergegeben und die einzelnen Schritte im folgenden kurz beschrieben (ausführliche Durchführungen siehe Material und Methoden).

2.1.5.1.1 Synthese der Benzyloxocarbonyl-[Z]-aminosäuren

Die Herstellung von Benzyloxocarbonyl-[Z]-aminosäuren gelingt mittels der Methode nach Bergmann und Zervas (1932). Die Aminosäuren werden mit Chlorameisensäurebenzylester in Gegenwart von Natronlauge über die *Schotten-Baumann-Reaktion* umgesetzt (Grassmann und Wünsch, 1958). Es werden (S)-Prolin zu (S)-Benzyloxocarbonyl-[Z]-(S)-prolin, (S)-Phenylalanin zu Benzyloxocarbonyl-[Z]-(S)-phenylalanin und (S)-Leucin zu Benzyloxocarbonyl-[Z]-(S)-leucin mit guten Ausbeuten (> 84 %) umgesetzt. Die

Aminosäuren Glycin, (*S*)-Alanin und (*S*)-Valin können auf diesem Weg nicht erhalten werden.

2.1.5.1.2 Synthese der Aminosäuremethylester

Die Umsetzung von Aminosäuren zu Aminosäuremethylestern gelingt, indem die zur Veresterung eingesetzte Aminosäure unter Zusatz von Thionylchlorid in Methanol (im Überschuß) gelöst, bis zur vollständigen Veresterung gerührt und das Produkt durch geeignete Methoden (Säulenchromatographie, Umkristallisation oder fraktionierte Destillation) gereinigt wird (Drauz et al., 1986). Auf diesem Weg werden die Aminosäuren Glycin, (*S*)-Alanin, (*S*)-Valin, (*S*)-Leucin, (*S*)-Phenylalanin und (*S*)-Prolin umgesetzt und in guten Ausbeuten (> 74 %) erhalten.

2.1.5.1.3 Synthese der Z-geschützten Dipeptidmethylester und Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-[Z]-Schutzgruppe

Nach Pickenhagen et al. (1975) können Benzyloxycarbonyl-[Z]-aminosäuren mit Aminosäuremethylestern in Gegenwart von Chlorameisensäureethylester und N-Methylmorpholin nach der gemischten Säureanhydridmethode umgesetzt werden. Der Vorteil dieser Reaktion besteht darin, daß die Dipeptide direkt zu dem entsprechenden Diketopiperazin abreagieren. Andere zur Synthese von Diketopiperazinen verwendete Methoden sind arbeitsaufwendiger, da die Synthese des Dipeptids, die Abspaltung der Schutzgruppen und die Cyclisierung zum Diketopiperazin in getrennten Reaktionen erfolgen (Gautschi und Schmid, 1997; Nitecki et al., 1968). Bei der Durchführung der von Pickenhagen et al. (1975) beschriebenen Synthesen zeigt sich aber, daß die Reaktion bei den Z-geschützten Dipeptiden stoppt und keine Cyclisierung zu den Diketopiperazinen einsetzt. Die Cyclisierung der prolin-haltigen Dipeptidmethylester kann entgegen den Angaben von Pickenhagen et al. (1975) augenscheinlich erst nach Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-[Z]-Schutzgruppe stattfinden.

Die Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-[Z]-gruppe gelingt durch katalytische Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle (Pickenhagen et al., 1975; Gautschi und Schmid, 1997; Houben und Weyl, 1974). In der Literatur ist bei dieser Methode eine teilweise oder vollständige Cyclisierung zum Diketopiperazin beschreiben, die hier lediglich für cis-cyclo(Pro-Gly) beobachtet werden kann (Houben und Weyl, 1974).

2.1.5.1.4 Synthese von Diketopiperazinen

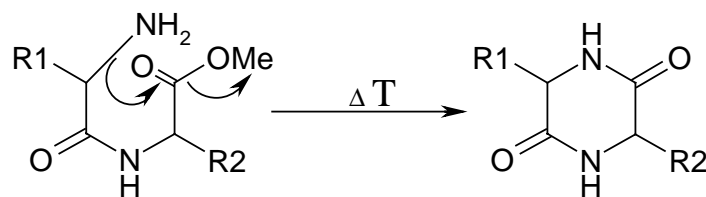


Abb. 39 Cyclisierung eines Dipeptidmethylesters zum Diketopiperazin.

Durch Erhitzen der Dipeptidmethylester in einem geeigneten Lösungsmittel erfolgt unter Ausbildung einer weiteren Peptidbindung die intramolekulare Cyclisierung zum Diketopiperazin (siehe Abb. 39). Pickenhagen et al. (1975) arbeiten mit n-Butanol/Toluol (3:1) als Lösungsmittelgemisch, welches einen Siedepunkt von $>110^{\circ}\text{C}$ besitzt. Bis auf cyclo(Pro-Pro) können alle weiteren Diketopiperazine auf diesem Weg aus ihren Dipeptidmethylestern gewonnen werden. Die Ausbeuten liegen zwischen 22,9 % und 75,1 % im Rahmen der Erwartungen, lediglich cis-cyclo(Pro-Leu) kann nur mit einer Ausbeute von 5,0 % synthetisiert werden.

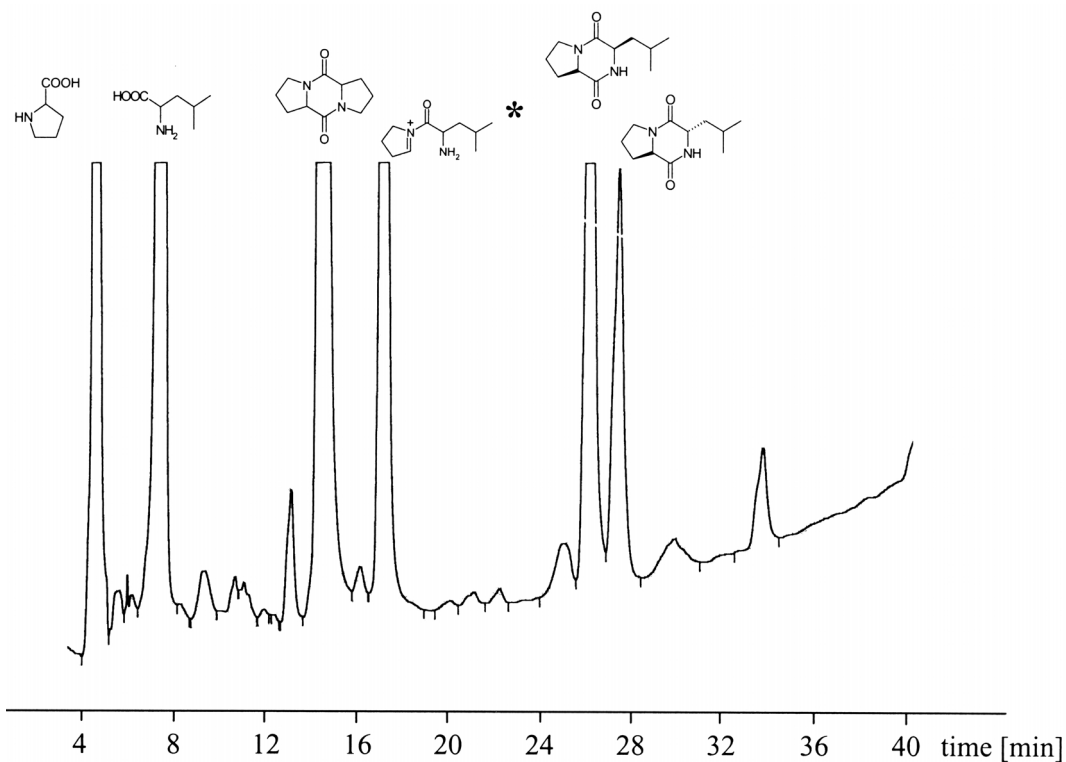


Abb. 40 UV-Spur (220 nm) des Chloroform-Extrakts der Modellröstung L-Prolin + L-Leucin; (*) postulierte Struktur)

2.1.5.2 Synthese von Diketopiperazinen über Röstung von Aminosäuren

Bereits Rizzi (1989) beschreibt die Bildung von Diketopiperazinen beim Erhitzen von Aminosäuren.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, werden die jeweiligen Aminosäuren mit der 10fachen Menge an Seesand vermengt und bei 290°C für 2 Minuten in einer geschlossenen Röstapparatur unter Stickstoffatmosphäre geröstet. Hier wird dieselbe Anordnung verwendet, die bereits bei der Röstung der isolierten Rohkaffee-Proteine eingesetzt wurde (siehe 2.1.1). Das abgekühlte Röstgemisch wird mehrfach mit Chloroform extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufnahme in Methanol/Wasser wird der Extrakt über LC-ESI-MS analysiert (siehe Material und Methoden). In Abb. 40 ist die UV-Spur des Chloroform-Extrakts der Modellröstung von L-Prolin und L-Leucin bei 220 nm wiedergegeben. Die Signale bei 14,5 min sowie bei 26,2 min und 27,4 min können bei Vergleich mit den chemisch synthetisierten Referenz-Verbindungen den Diketopiperazinen cyclo(Pro-Pro)

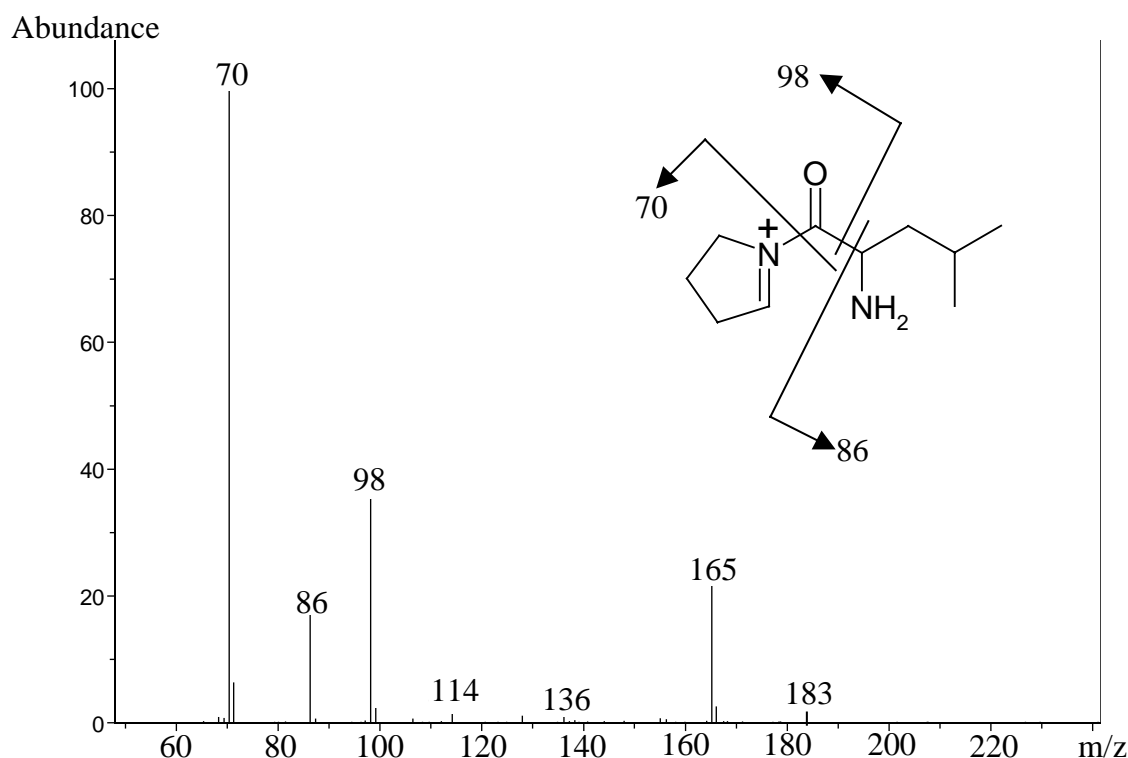


Abb. 41 MS/MS-Spektrum der Masse 183 m/z und postulierte Struktur

sowie cis-cyclo(Pro-Leu) und trans-cyclo(Pro-Leu) zugeordnet werden. Unter den verwendeten Röstbedingungen werden die Diketopiperazine somit als Hauptkomponenten gebildet. Augenscheinlich werden beide Isomere eines jeden Diketopiperazins gebildet, wobei das cis-Isomer dominiert. Ferner finden sich die nicht umgesetzten Aminosäuren L-Prolin bei 4,5 min und L-Leucin bei 7,4 min. Das Signal bei 17,2 min kann weder einer Aminosäure noch einem Diketopiperazin zugeordnet werden. Die Masse von 183 m/z und das zugehörige MS/MS-Spektrum deuten auf ein offenes decarboxyliertes Dipeptid hin. Die auftretenden Signale lassen sich durch Fragmentierung des Dipeptids erklären (siehe Abb. 41). Eine Absicherung der Struktur erfolgt nicht. Wie hier für die Modellröstung von L-Prolin und L-Leucin dargestellt, ergeben sich vergleichbare Chromatogramme auch für die weiteren durchgeführten Modellröstungen mit den Diketopiperazinen als Hauptverbindungen. In allen Fällen werden beide möglichen Isomere erhalten.

2.1.5.2.1 Isolierung mittels semipräparativer RP-HPLC

Zur Isolierung der Diketopiperazine wird die Trennung auf die semipräparative RP-HPLC übertragen. Gearbeitet wird mit einer Nucleosil 100-7 C18 250x21 mm Säule und einer Nucleosil 100-7 C18 50x10 mm Vorsäule (Macherey-Nagel, Düren, FRG). Die Flußrate

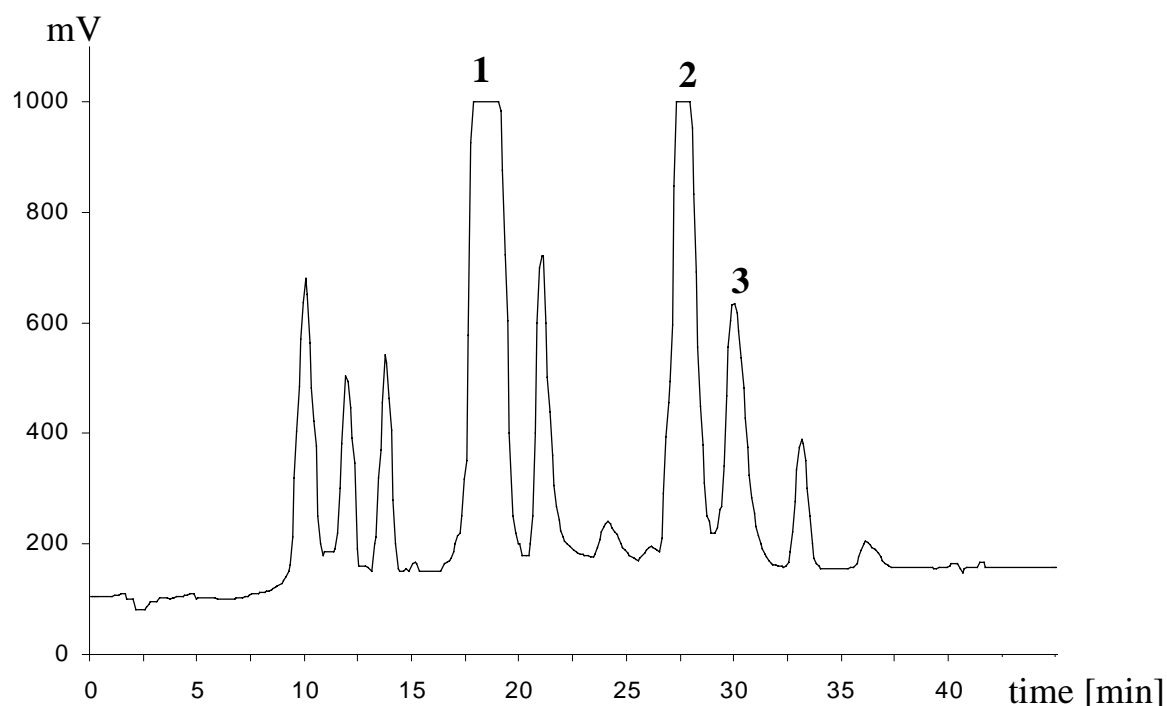


Abb. 42 UV-Spur (220 nm); Chloroform-Extrakt der Modellröstung von L-Prolin + L-Leucin; cyclo(Pro-Pro) (1), cis-cyclo(Pro-Leu) (2) und trans-cyclo(Pro-Leu)

beträgt 5 mL/min, bei einer Probenaufgabe von ca. 50 mg. Es wird bei 220 nm detektiert. Es wird eine Trennung ähnlich der der analytischen RP-HPLC erreicht (siehe Abb. 42). Mit den gewählten Bedingungen können die Diketopiperazine isoliert werden und zeigen sich bei Analyse mittels ESI-MS und ^1H -NMR chemisch rein (siehe Anhang XIII).

2.1.5.2.2 Isolierung mittels High-Speed Countercurrent Chromatography

Als alternative Trenntechnik, die ebenfalls die Trennung von Substanzen in präparativem Maßstab ermöglicht, bietet sich die High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) an. Hierbei handelt es sich um eine verteilungschromatographische Technik, bei der die Trennung der Substanzen durch ständige Mischung und Entmischung zweier nicht miteinander mischbarer Phasen erreicht wird. Durch Rotation wird eine der Flüssigkeiten stationär im Trennschlauch gehalten, während die andere über eine HPLC-Pumpe durch den Schlauch gefördert wird. Durch die sich ständig wiederholenden Verteilungsvorgänge werden die Substanzen entsprechend ihren Verteilungskoeffizienten zwischen den beiden Phasen getrennt. Substanzen mit größeren Verweilzeiten in der stationären Phase werden zurückgehalten und eluieren spät, Substanzen mit kurzen Verweilzeiten eluieren früh.

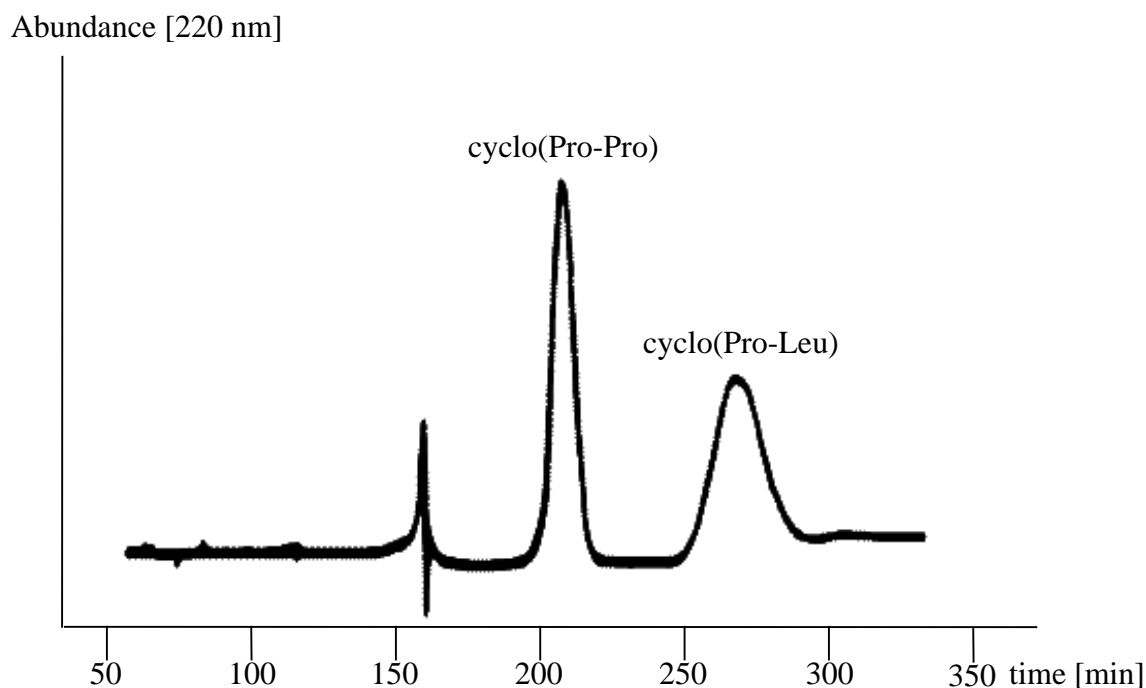


Abb. 43 UV-Spur (220 nm) HSCCC-Trennung der L-Prolin + L-Leucin Modellröstung

Detailliertere Informationen finden sich bei Degenhardt et al. (2000). In Abb. 43 ist das Chromatogramm einer Trennung des Extraktes der Prolin-Leucin Modellröstung wiedergegeben. Mit dem verwendeten Trennsystem wird die Isolierung der Diketopiperazine aus der Röstmischung erreicht. Bei den Signalen bei 210 und 290 Minuten handelt es sich um cyclo(Pro-Pro) und cyclo(Pro-Leu). Eine Trennung der Isomeren, wie sie die semipräparative HPLC ermöglicht, wird nicht erreicht. Das Signal bei 290 Minuten stellt sich bei einer LC-ESI-MS-Analyse als Mischung aus cis-cyclo(Pro-Leu) und trans-cyclo(Pro-Leu) heraus.

2.1.6 Nachweis weiterer Diketopiperazine in Röstkaffee

Die Analyse des Chloroform-Extraktes der Röstkaffee-Fraktionierung (siehe 2.1.3) über LC-ESI-MS und GC-EI-MS hatte neben Coffein und den prolin-haltigen Diketopiperazinen eine Reihe weiterer Signale gezeigt. Basierend auf der für die Quantifizierung der Diketopiperazine entwickelten Probenaufarbeitung wird der Chloroform-Extrakt über Sephadex G10 fraktioniert (siehe Abb. 44).

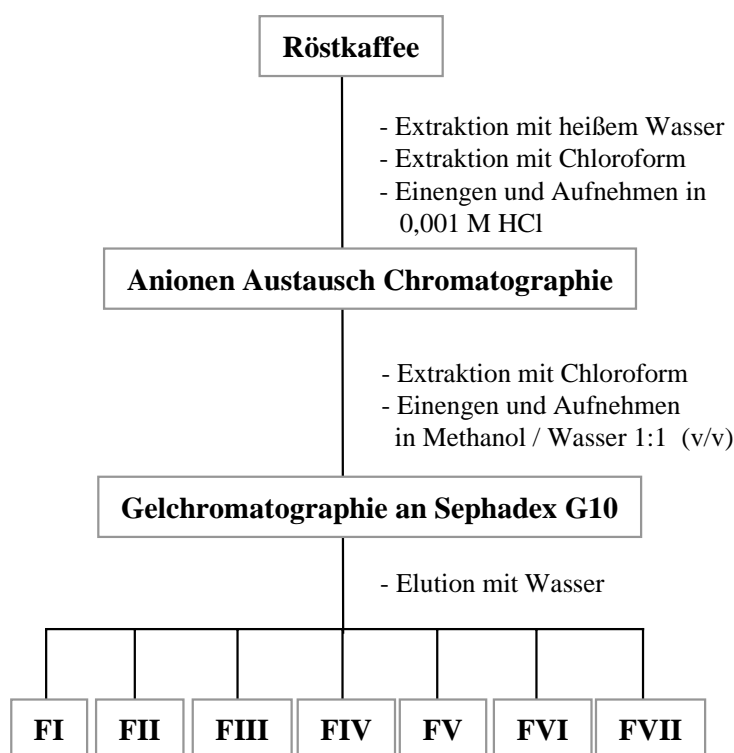


Abb. 44 Röstkaffee-Fraktionierung zum Nachweis weiterer Diketopiperazine in Röstkaffee

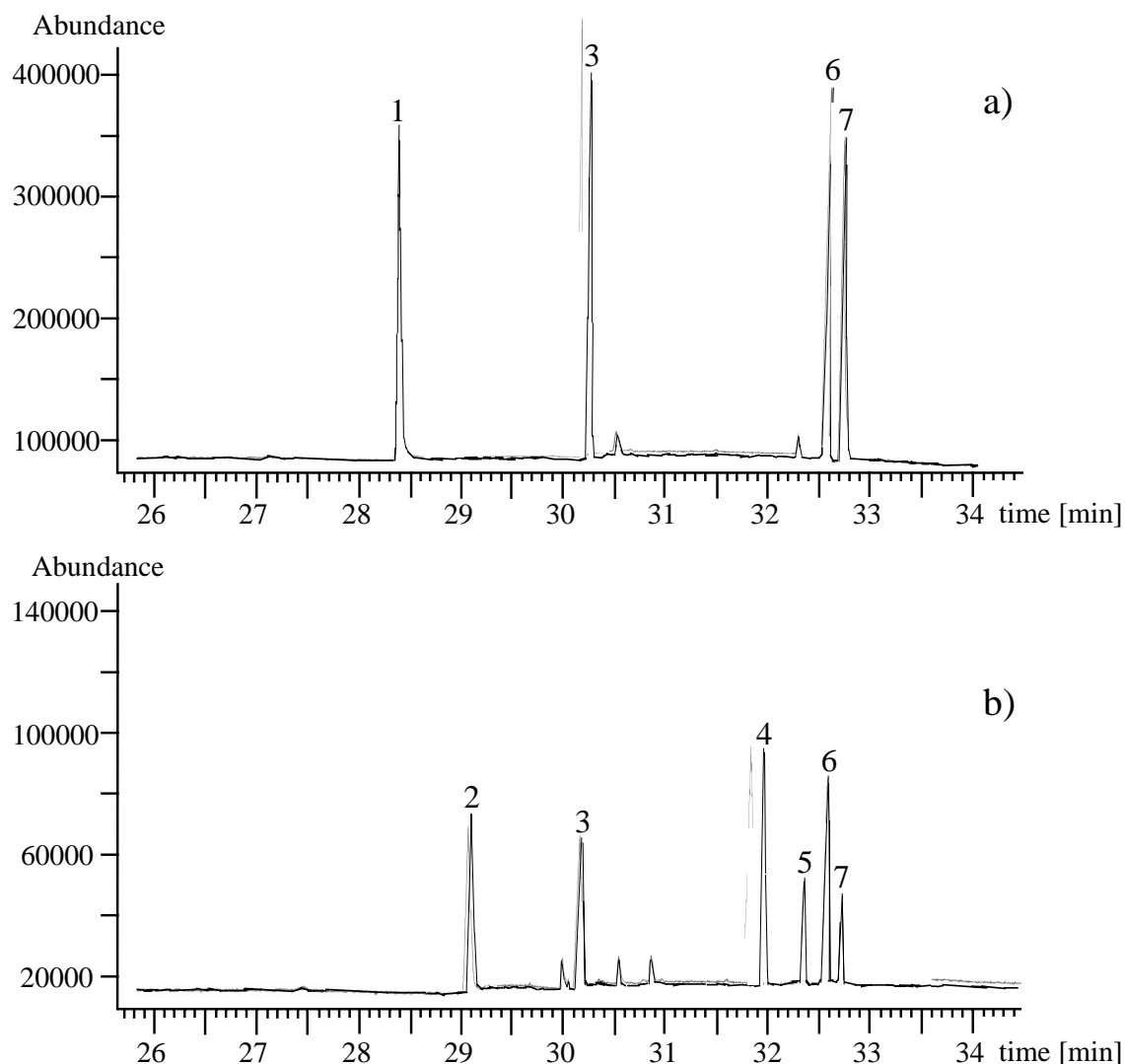


Abb. 45 GC-EI-MS-Analyse: Mischstandard (a) und Ausschnitt des GC-EI-Chromatogramms der Sephadex Fraktion VI (b); cis-cyclo(Phe-Ala) (1), trans-cyclo(Phe-Val) (2), cis-cyclo(Phe-Val) (3), trans-cyclo(Phe-Leu) (4), trans-cyclo(Phe-Ile) (5), cis-cyclo(Phe-Leu) (6) und cis-cyclo(Phe-Ile) (7)

Die Fraktionen werden über LC-ESI-MS und GC-EI-MS analysiert. Neben den Haupt-Diketopiperazinen cyclo(Pro-Ile), cyclo(Pro-Leu), cyclo(Pro-Phe), cyclo(Pro-Pro) und cyclo(Pro-Val) in beiden isomeren Formen sowie Coffein können weitere Diketopiperazine identifiziert werden. Durch Vergleich mit synthetisierten Referenz-Verbindungen sind dies: cyclo(Pro-Gly) und cyclo(Pro-Ala), sowie cyclo(Phe-Ile), cyclo(Phe-Leu) und cyclo(Phe-Val) (Strukturformeln siehe Anhang XII). Bis auf cyclo(Pro-Gly), für das nur eine isomere Form denkbar ist, werden alle Diketopiperazine als cis- und als trans-Isomer im Röstkaffee nachgewiesen. Im Verhältnis zu den quantifizierten fünf Haupt-Diketopiperazinen liegen die

Gehalte aber signifikant niedriger. In Abb. 45 ist ein Mischstandard der phenylalanin-haltigen Diketopiperazine (a) einem Ausschnitt des EI-Chromatogramms der Sephadex Fraktion VI gegenübergestellt (b).

Die Identifizierung der Diketopiperazine wird sowohl in der LC-ESI-MS wie der GC-EI-MS Analyse durch Vergleich mit den synthetisierten Referenzen abgesichert. Die Retentionszeiten, die EI-MS bzw. ESI-MS/MS-Spektren der Signale in den Sephadex-Fractionen sind identisch mit denen der Referenzen wie in Abb. 46 für cis-cyclo(Pro-Ala) verdeutlicht. Mit beiden Methoden kann der Nachweis abgesichert werden.

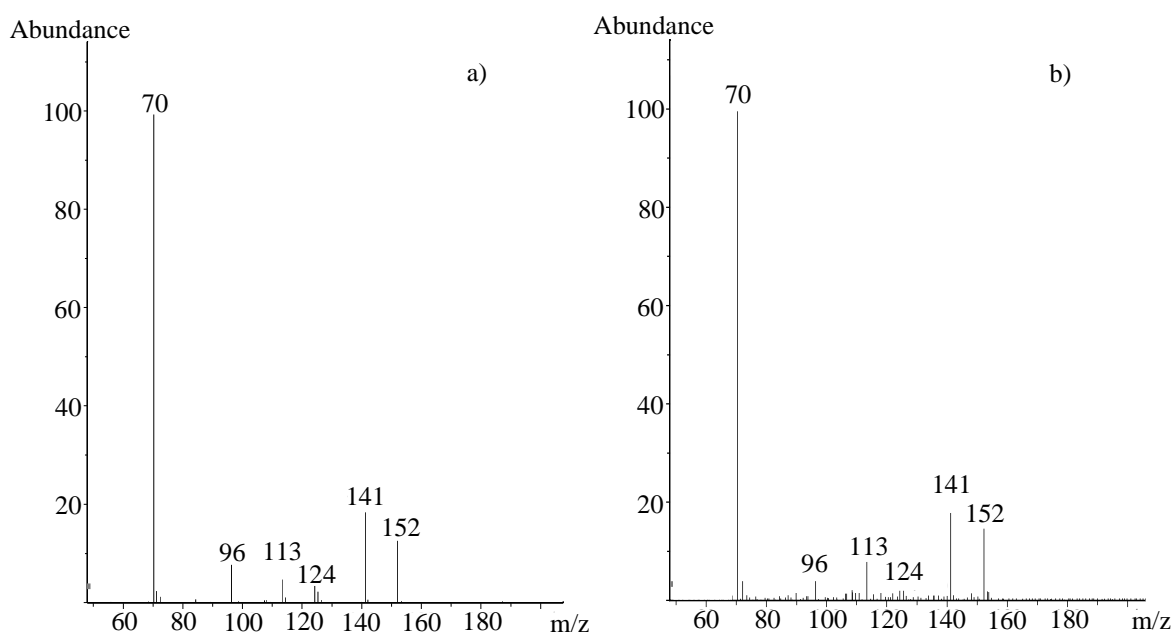


Abb. 46 LC-ESI-MS/MS-Spektren der cis-cyclo(Pro-Ala) Referenz (a) und Fraktion III der Sephadex G10 Fraktionierung bei identischer Retentionszeit.

Die Identifizierung von cyclo(Pro-Gly) sowie der beiden cyclo(Pro-Ala) Isomeren in Röstkaffee entspricht den Erwartungen. Glycin und Alanin zählen ebenso wie Leucin, Isoleucin, Prolin, Valin und Phenylalanin (die mit Prolin die Haupt-Diketopiperazine bilden) zu den stabilen Aminosäuren, die während der Kaffee-Röstung nur minimalen Abbau erfahren (siehe 2.1.1.2).

Im Gegensatz dazu ist die Identifizierung von phenylalanin-haltigen Diketopiperazinen unerwartet. Im Falle von Prolin wird durch die intramolekulare Cyclisierung zum cyclischen Dipeptid eine Doppelring- bzw. im Falle von cyclo(Pro-Pro) eine Dreiringstruktur aufgebaut, die sich thermisch als ausgesprochen stabil zeigt, wie die Quantifizierung der prolin-haltigen Diketopiperazine in der Kaffee-Röstserie (siehe 2.1.4.1.6) belegt. Bei den phenylalanin-

haltigen Diketopiperazinen wird keine Doppel- oder Dreiringstruktur durch die intramolekulare Cyclisierung aufgebaut, die das Molekül bei den hohen Rösttemperaturen der Kaffeeröstung stabilisiert. Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Valin gehören allerdings zu den mengenmäßig dominanten Aminosäuren in Kaffee und gleichzeitig zu den thermisch stabilsten. Eine Bildung dieser Diketopiperazine entsprechend den prolin-haltigen Diketopiperazinen ist demzufolge durchaus denkbar.

2.1.7 Sensorische Analyse

Die sensorische Analyse ist eine analytische Methode zur Lebensmittelkontrolle, die auf den fünf menschlichen Sinnen: Hören, Sehen, Riechen, Schmecken und Fühlen basiert. Die Methode hat trotz der rasanten Entwicklung der instrumentellen Analytik ihre Bedeutung bewahrt bzw. sogar ausgebaut. Der große Vorteil der Sensorik gegenüber instrumentellen Methoden, der sich aber auch zu einem Nachteil entwickeln kann, liegt in ihrer Komplexität. Von den Prüfpersonen wird ein Gesamteindruck des Lebensmittels bzw. der zu analysierenden Probe erfaßt z.B. Aroma, Textur und Geschmack. Ein technisches Gerät hingegen kann nur einzelne Komponenten, also entweder Aroma oder Textur bestimmen. Vor allem in Bereichen, in denen ein instrumenteller Sensor fehlt, wie bei der Einstufung von Geruchs- und Geschmackseindrücken und deren Intensitäten, ist die Sensorik der instrumentellen Analytik überlegen und oft einziges zur Verfügung stehendes „Meßinstrument“.

Einen weiteren Gewinn an Bedeutung errang die Sensorik durch die immer stärkere Professionalität. Die früher häufig durchgeführte Organoleptik geht von einer rein gefühlsmäßig ausgeführten Geruchs- und Geschmacksprüfung aus und ist daher sehr subjektiv, unzuverlässig und statistisch nicht auswertbar (Jellinek, 1981). Im Gegensatz dazu geht die heutige Sensorik von gut geschulten Prüfern aus, die die Fähigkeit besitzen oder erlernt haben, objektive Qualitätsbeurteilungen über Lebensmittel abzugeben. Im Zusammenhang mit wissenschaftlichen Prüfmethoden, die in Gesetzen und Verordnungen des Lebensmittelrechtes festgelegt sind, sind sensorische Ergebnisse statistisch auswertbar und abgesichert. Die Ergebnisse werden dadurch reproduzierbar und die Prüfpersonen können in ihrer Genauigkeit mit einem Meßinstrument verglichen werden.

2.1.7.1 Aufbau und Training des Sensorik-Panels

Generell sind als Proband in der Sensorik alle interessierten Personen geeignet, wobei das Alter der Prüfer nur in begrenztem Umfang eine Rolle spielt. Jüngere Personen haben im Vergleich zu älteren mehr Geschmackspapillen, letztere jedoch eine größere Erfahrung und im allgemeinen eine verbesserte Konzentrationsfähigkeit. Geschlecht und auch die Rauchgewohnheiten sind nebensächlich. In jeder Gruppe von Männern und Frauen und von Rauchern und Nichtrauchern gibt es empfindliche und weniger empfindliche Personen. Die Sensitivität für Geruchs- und Geschmacksempfinden unterliegt genetisch bedingten Schwankungen, insbesondere für die Wahrnehmung von Bitterkeit (siehe 1.3). Die Prüfer sollten alle über einen normalen Geruchs- und Geschmackssinn verfügen, der im allgemeinen durch Training noch steigerungsfähig ist. Personen, die von vornherein überempfindlich bei bestimmten Sinneseindrücken reagieren oder solche, die nur eine schwache Wahrnehmung für die zu untersuchenden Sinneseindrücke zeigen, sind für ein Sensorik-Panel ungeeignet. Ebenso sollten die Prüfer, die an der Sensorik teilnehmen, gesund sein; insbesondere bei Erkältungskrankheiten ist von einer Teilnahme an der Sensorik abzuraten, da Geruchs- und Geschmacksvermögen in diesem Fall stark beeinträchtigt sein können und so die Ergebnisse verfälschen.

Der Aufbau eines Panels läßt sich in zwei Abschnitte gliedern. Im ersten Abschnitt sind die Personen mit ihren eigenen Sinnen vertraut zu machen. Sie sollen lernen, ihre sensorischen Grundfähigkeiten einzuschätzen. Durch Wiederholungen von Übungen und Variationen der bereits durchgeführten Tests sollen diese Grundfähigkeiten gesteigert werden. Eine Möglichkeit hierzu ist die Zuordnung der Grundgeschmacksarten mittels Standardsubstanzen sowie die Bestimmung von Schwellenwerten, also die Bestimmung der Empfindlichkeit eines Sinnes eines Probanden (Jellinek, 1981). Beim Geschmack spielen die Schwellenwerte für die Grundgeschmacksarten eine wichtige Rolle, wenn es nach dem Training des Panels um die Bestimmung der Grundgeschmackseigenschaften von Substanzen geht. Im zweiten Abschnitt werden Methoden an Standardsubstanzen erlernt, da diese im Idealfall nur einen Sinneseindruck in Anspruch nehmen. Dadurch steht die Methodik der Sensorik im Vordergrund, denn der Proband muß nicht einen Sinneseindruck unter vielen abstrahieren. Die Probanden werden an verschiedene später in der Sensorik verwendete Verfahren gewöhnt und ihre Geeignetheit und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getestet: hierzu zählen vor allem Rangordnungsprüfungen und Unterscheidungsprüfungen wie Triangeltest, Paarmethode

usw. All diese Testmethoden dienen zum Aufbau eines Sensorik-Panels. Die Prüfung auf Eignung erfolgt nach den offiziellen Methoden des § 35 LMBG:

- Schulung von Prüfpersonen für sensorische Prüfungen (Bd. I/1 L 00.90 – 10)
- Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit (Bd. I/1 L 00.90 – 9)
- Dreiecksprüfungen (Bd. I/1 L 00.90 – 7)
- Rangordnungsprüfungen (Bd. I/1 L 00.90 – 4)

Die Prüfung der Grundgeschmacksarten Süß, Sauer, Salzig und Bitter mit Saccharose, Coffein, Natriumchlorid und Citronensäure sowie die Bestimmung der Geschmacks-erkennungsschwellen mit Coffein gelten als ideale Testverfahren, um ein Sensorik-Panel zu testen und zusammenzustellen (Jellinek, 1981; Neumann und Molnar, 1991; Flidner und Wilhelmi, 1989). Bei der Bestimmung der Grundgeschmacksarten traten beim süßen Geschmack im Gegensatz zu den drei anderen Grundgeschmacksarten Schwierigkeiten auf. Es zeigt sich eine deutlich schlechtere Reproduzierbarkeit (Bormann, 1999). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der kürzlich vorgenommenen Reduzierung der Saccharosekonzentration in der § 35 Methode.

Aus einer Gruppe von 21 Probanden werden entsprechend ihrer sensorischen Fähigkeiten sechs Studenten zu einem Sensorik-Panel zusammengestellt. Das Panel wird mit Dreiecksprüfungen (Triangeltests) und Rangordnungsprüfungen entsprechend § 35 LMBG trainiert und die Zuverlässigkeit in Bezug auf die Erkennung des Bittergeschmacks überprüft. Die Auswertung erfolgt über die üblichen statistischen Verfahren wie die Binomial-Verteilung und das χ^2 -Verfahren (Neumann und Molnar, 1991). Bei der statistischen Auswertung zeigten sich bei den Dreiecksprüfungen hochsignifikante ($S = 99\%$) bis signifikante ($S = 95\%$) Ergebnisse. Bei den Rangordnungsprüfungen wird in allen Fällen eine statistische Sicherheit von 99 % erreicht (Bormann, 1999). Eine statistische Sicherheit von 95 % und mehr gilt in der Sensorik als zufriedenstellendes Ergebnis (Flidner und Wilhelmi, 1989), sodaß das Panel damit die nötige Zuverlässigkeit für die Verkostung von Fraktionen/Proben auf Bitterkeit besitzt.

2.1.7.2 Minimierung der Probenmenge

Da sich im Laufe der Fraktionierung des Röstkaffees und auch der anderen durchgeführten Versuche schnell die Problematik einer mengenmäßig begrenzten Probenmenge auftat, wurde nach einer Methode gesucht, den Bedarf an Probenmaterial für die sensorische Verkostung so gering wie möglich zu halten. Gleichzeitig sollte sich dabei aber die erreichte hohe Signifikanz möglichst nicht verschlechtern. In der Literatur finden sich verschiedene Techniken zur Minimierung des Probenvolumens unter Verwendung von Löffeln oder Uhrgläsern als Darreichungsgerät (Neumann und Molnar, 1991, Wieser und Belitz, 1975). Aus praktischen Gründen wird bei der Durchführung nicht auf ein Uhrglas, sondern einen Löffel zurückgegriffen. Die Proben werden in Bechergläser gefüllt und mit einer Pipette auf den Löffel gegeben. Dem Panel war vorgegeben, so wenig Probenmaterial wie möglich für die Verkostung zu verwenden. Bei der Auswertung der Ergebnisse der durchgeführten Dreiecksprüfungen mittels Binomial- und X^2 -Verfahren zeigte sich, daß das Panel zu Beginn mit der neuen Methode leichte Schwierigkeiten hatte. Das Signifikanzniveau fällt auf 90-99 %, bei wiederholter Durchführung liegt die Signifikanz dann aber wieder wie gefordert über 95 %. Damit ist die Methode geeignet und bietet den entscheidenden Vorteil, daß je Verkostung der Probenbedarf pro Testperson bei nur ca 10 mL liegt.

2.1.7.3 Sensorische Analyse der Diketopiperazine

Bei der Verkostung der im Kakao identifizierten Diketopiperazine stellten Pickenhagen et al. (1975) Bitterkeit im Konzentrationsbereich von 30 bis 50 ppm fest. Dabei finden sie keinen Unterschied in der entfalteten Bitterkeit zwischen den beiden Isomeren eines Diketopiperazins. Auch Gautschi und Schmid (1997), die prolin-haltige Diketopiperazine in Bier identifizierten, finden Bitterkeits-Erkennungsschwellen von 10-50 ppm bei der Verkostung in Wasser (siehe Tab. 7).

Tab. 7 Geschmackseindruck und Schwellenwerte der in Bier identifizierten Diketopiperazine nach Gautschi und Schmid (1997)

Verkostetes Diketopiperazin	Geschmack und Bitterkeitsschwelle [ppm]
cyclo(Pro-Ala)	trocknend, leicht adstringend bei 50 ppm
cyclo(Pro-Val)	anhaltend metallisch, salzig bei 10 ppm
cyclo(Pro-Ile)	anhaltend metallisch bei 30 ppm
cyclo(Pro-Leu)	bitter, salzig bei 30 ppm
cyclo(Pro-Met)	„mundfüllend“, trockenend bei 30 ppm
cyclo(Pro-Phe)	trocknend, leicht adstringend bei 50 ppm
cyclo(Pro-Pro)	bitter bei 50 ppm

Zur Kontrolle der Daten von Gautschi und Schmid (1997) werden die prolin-haltigen Diketopiperazine verkostet. Es wird eine Erkennungsschwellenprüfung mit der unter 2.1.7.2 erarbeiteten Darreichungsmethode durchgeführt. Verkostet werden die fünf Haupt-Diketopiperazine des Röstkaffees. Die Verkostungen werden für jede Substanz mehrfach wiederholt. Allen verkosteten Diketopiperazinen wird Bitterkeit im Bereich von 30-50 ppm zugesprochen, wie aus Tab. 8 ersichtlich. Der Bittergeschmack der Substanzen ist von verschiedenen untergeordneten Geschmackseindrücken begleitet, wie sie auch von Gautschi und Schmid (1997) beschrieben werden.

Tab. 8 Mittlere Schwellenwerte der in Wasser verkosteten Diketopiperazine

Verkostetes Diketopiperazin	Geschmack und Bitterkeitsschwelle [ppm]
cis-cyclo(Pro-Val)	40 ppm ; bitter, adstringierend
trans-cyclo(Pro-Val)	37 ppm ; bitter, leicht metallisch
cis-cyclo(Pro-Ile)	30 ppm ; bitter, schwach brenzlich
cis-cyclo(Pro-Leu)	35 ppm ; bitter, nahezu kein Unterton
trans-cyclo(Pro-Leu)	30 ppm ; bitter, nahezu kein Unterton
cis-cyclo(Pro-Phe)	30 ppm ; bitter, metallisch
trans-cyclo(Pro-Phe)	32 ppm ; bitter, metallisch
cis-cyclo(Pro-Pro)	32 ppm ; bitter, schwach metallisch

Die erzielten Ergebnisse decken sich dementsprechend weitgehend mit den Literaturwerten. Auch die bereits von Pickenhagen et al. (1975) beschriebene Beobachtung, daß die Isomerie der Diketopiperazine keinen Einfluß auf ihre Bitterkeit ausübt, kann hier bestätigt werden. Die Erkennungsschwellen wie auch der Geschmack von cis- und trans-Isomeren eines Diketopiperazins sind identisch.

Nach der Bestimmung der Einzelschwellenwerte und der Bestätigung der Bitterkeit der Diketopiperazine stellt sich die Frage der Beeinflussung der Substanzen untereinander bzw. mit anderen Kaffeeinhaltsstoffen. Es ist von einer Vielzahl an sensorischen Analysen bekannt, daß sich Geschmacksstoffe gegenseitig beeinflussen (siehe 1.3.2), und da Pickenhagen et al. (1975) einen synergistischen Effekt der im Kakao identifizierten Diketopiperazine mit Theophyllin nachweisen konnten, ist diese oder eine ähnliche Wirkung im Kaffee nicht auszuschließen. In diesem Zusammenhang wird als erstes die Beeinflussung der Diketopiperazine untereinander getestet. Es werden Gemische von Diketopiperazinen auf ihre Bitterkeitserkennungsschwellen hin verkostet.

Tab. 9 Mittlere Erkennungsschwelle der Diketopiperazin-Mischungen

Verkostetes Gemisch	Geschmack und Bitterkeitsschwelle [ppm]
cis-cyclo(Pro-Pro) + cis-cyclo(Pro-Leu)	35 ppm ; bitter, schwach metallisch
cis-cyclo(Pro-Pro) + cis-cyclo(Pro-Phe) + cis-cyclo(Pro-Leu)	40 ppm ; bitter, minimaler Unterton
cis-cyclo(Pro-Pro) + cis-cyclo(Pro-Phe)	47 ppm ; bitter, leicht adstringierend, brenzlich
cis-cyclo(Pro-Pro) + cis-cyclo(Pro-Phe) + cis-cyclo(Pro-Leu) + cis-cyclo(Pro-Ile)	30 ppm ; bitter, leichter Röstgeschmack
cis-cyclo(Pro-Pro) + cis-cyclo(Pro-Phe) + cis-cyclo(Pro-Leu) + cis-cyclo(Pro-Ile) + cis-cyclo(Pro-Val)	40 ppm ; bitter, leicht metallisch

Die Bitterkeitsschwellenwerte der getesteten Mischungen entsprechen denen der Einzelverkostungen. Die Ergebnisse sprechen für ein additives Verhalten der prolin-haltigen Diketopiperazine. Obwohl die Einzelverbindungen unter der Erkennungsschwelle enthalten sind, erfolgt dennoch eine Wahrnehmung des bitteren Geschmacks in der gleichen

Größenordnung wie bei Verkostung der Einzelverbindungen. Solche additiven Geschmackswahrnehmungen sind von anderen Geschmacksstoffen wie Peptiden bekannt. Neben einer additiven Beziehung ist ferner eine Beeinflussung des Geschmacks durch andere Kaffeeinhaltsstoffe denkbar. Eine synergistische Wirkung ist vor allem mit anderen Bitterstoffen, die über die gleichen Wege mit den Geschmackszellen in Wechselwirkung treten bzw. die gleiche Zellantwort auslösen, denkbar. Einen synergistischen Effekt von Diketopiperazinen mit Theophyllin konnten Pickenhagen et al. (1975) im Kakao beobachten und damit die Bitterkeit des Kakaos erklären. Da im Kaffee Coffein als bitteres Hauptalkaloid auftritt, wird auf einen synergistischen Effekt mit Coffein getestet. Es wird ein Triangeltest mit konstanter Coffein-Konzentration durchgeführt. Einer der Lösungen wird cyclo(Pro-Pro) unterhalb seines Schwellenwertes zugesetzt. Im Falle eines synergistischen oder additiven Effektes zwischen Coffein und den Diketopiperazinen sollte diese Lösung eine intensivere Bitterkeit aufweisen. Die Verkostung wird mehrfach durchgeführt, liefert aber kein eindeutiges Ergebnis. Die mit Diketopiperazin-Zusatz versehene Probe wurde durchschnittlich von 70 % der Probanden als bitterer eingestuft. Dieser Prozentsatz reicht nicht zur Annahme oder Ablehnung der Hypothese aus, läßt aber die Möglichkeit eines Synergismus offen.

2.1.8 Schlußfolgerung

Mit dem Nachweis von Diketopiperazinen konnte eine Gruppe von bisher unbekannten Bitterstoffen in Röstkaffee identifiziert werden. Die Identifizierung der Substanzen in den gerösteten Kaffeeproteinen bestätigt die Rohkaffee-Proteine als Prekursoren der DKPs und die stetige Zunahme in den Gehalten deckt sich mit der fortschreitenden Proteindegradation während des Röstprozesses. Der Nachweis der Diketopiperazine als Röstprodukte von Kaffee-Proteinen hat über den Kaffee hinaus Bedeutung, als daß davon auszugehen ist, daß die Substanzen generelle Abbauprodukte der thermischen Proteindegradation darstellen und mit ihnen zumindest ein Teil der bekannten Bitterkeit von erhitzten Proteinen (Jugel et al., 1976) zu erklären ist.

Die Quantifizierung der Hauptdiketopiperazine des Röstkaffees zeigt mit der zu beobachteten signifikanten Steigerung der Gehalte eine zur Bitterkeit positive Korrelation (Chen, 1979). Allerdings liegen ihre Gehalte in Handelskaffees mit 5-7 mg/50g Röstkaffee unter der Bitterkeits-Erkennungsschwelle von 20-30 mg/L und es ist fraglich, ob die Substanzen für die

Bitterkeit des Röstkaffees eine Rolle spielen. Basierend auf der Tatsache, daß zwischen Diketopiperazinen und Theobromin im Kakao ein synergistischer Effekt beobachtet wurde, und mit Coffein eine dem Theobromin nahstehende Bitterkomponente in großer Menge zugegen ist, kann hier ein entsprechender Synergismus vermutet werden, dermit den durchgeführten Analysen allerdings weder bestätigt noch dementiert werden konnte. Im Falle der analysierten Espressos finden sich mit 20-25 mg/50g Diketopiperazin-Gehalte Werte im Schwellenwertbereich und es kann vermutet werden, daß die Substanzen hier einen Beitrag zur Bitterkeit leisten.

Für eine abschließende Beurteilung zur Bedeutung der Diketopiperazine für die Kaffeebitterkeit wären weitgehende sensorische Analysen mit einem weit größeren als dem zur Verfügung stehenden Sensorik-Panel nötig. Da eine solche sensorische Analyse zum einen nicht möglich war und zum anderen auch nicht Ziel der Arbeit, bleibt eine abschließende Beurteilung hier offen.

2.2 Chlorogensäure-Derivate in geröstetem Kaffee

Die Verkostung der einzelnen Fraktionen der Kaffee-Aufarbeitung hatte im Methanol-Eluat der Polyamidsäule mit 0,46 g/L eine sehr niedrige Bitterkeits-Erkennungsschwelle ergeben (siehe 2.1.3.1). Da Coffein und die Diketopiperazine im Wasser-Eluat der Polyamidsäule nachgewiesen werden konnten, muß das Methanol-Eluat demnach bisher unbekannte Bitterstoffe enthalten.

2.2.1 Fraktionierung des Methanol-Eluats

Das Methanol-Eluat wird gelchromatographisch an Sephadex G10 fraktioniert (Bedingungen siehe 2.1.1). Das Gel wird davon abweichend in Methanol zum Quellen gebracht, konditioniert und nach Aufgabe der in Methanol aufgenommenen gefriergetrockneten Fraktion mit Methanol eluiert. Die Elution wird mit einem Durchfluß-Photometer bei 253 nm überwacht. Im Chromatogramm lassen sich zwei intensive Banden erkennen, die kurz hintereinander von der Säule eluieren. Die mittleren Ausbeuten sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben (ausführliche Daten siehe Anhang XIV).

Tab. 12 Mittlere Ausbeuten der Sephadex G10 Fraktionierung des Methanol-Eluats der Polyamidsäule der Röstkaffee-Fraktionierung (siehe 2.1.1)

Fraktion	Mittlere Ausbeute [%]
I	0,5
II	5
III	10
IV	25
V	13
VI	27
VII	15
VIII	2

2.2.1.1 Screening mit RP-HPLC-DAD

Die Fraktionen werden über eine RP-18-Phase mit einem Methanol/Essigsäure-Gradienten vermessen und Spektren im UV-Bereich von 200 bis 400 nm aufgenommen. In Abb. 47 ist das Chromatogramm der Fraktion VI bei 325 nm wiedergegeben.

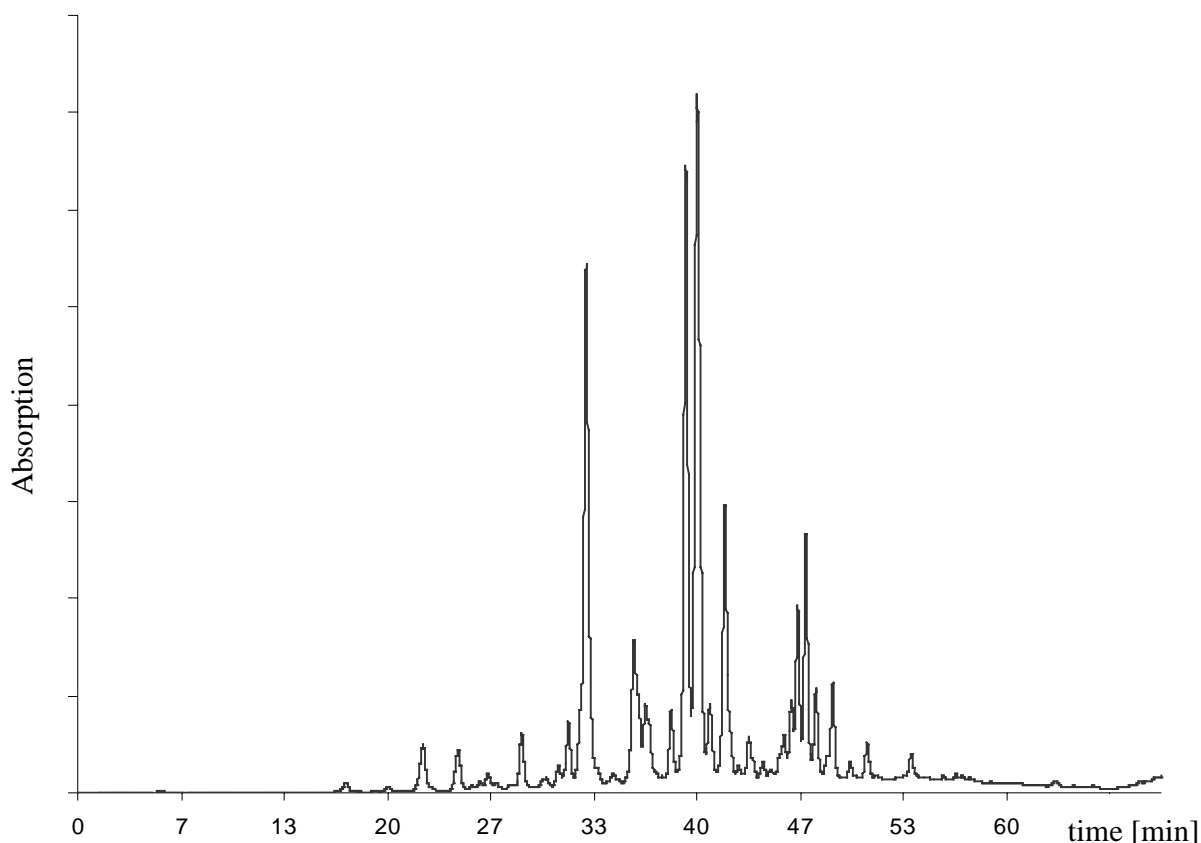


Abb. 47 UV-Chromatogramm der Fraktion VI der Sephadex-Fraktionierung bei 325 nm

Die UV-Spektren der Hauptsignale zeigen im Bereich von 270-375 nm charakteristische Maxima. Solche Spektren sind typisch für Substanzen des Chlorogensäure-Typs. Je nach in der Chlorogensäure enthaltener phenolischer Säure (Kaffee-, Ferula-, Cumarsäure etc.) variiert Form und Adsorptionsmaximum. In Abb. 48 ist das UV-Spektrum der 5-Caffeoyl-Chinasäure dem des Signals bei $R_t = 39,5$ min der Fraktion VI gegenübergestellt. Die Übereinstimmung der Spektren läßt auf Kaffeesäure als phenolischen Bestandteil schließen. Die Adsorption von Polyphenolen, wie den Chlorogensäuren und anderen phenolischen Kaffeebestandteilen an Polyamid, wie es bei der Kaffee-Aufarbeitung verwendet wurde (siehe 2.1.3), beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen phenolischen

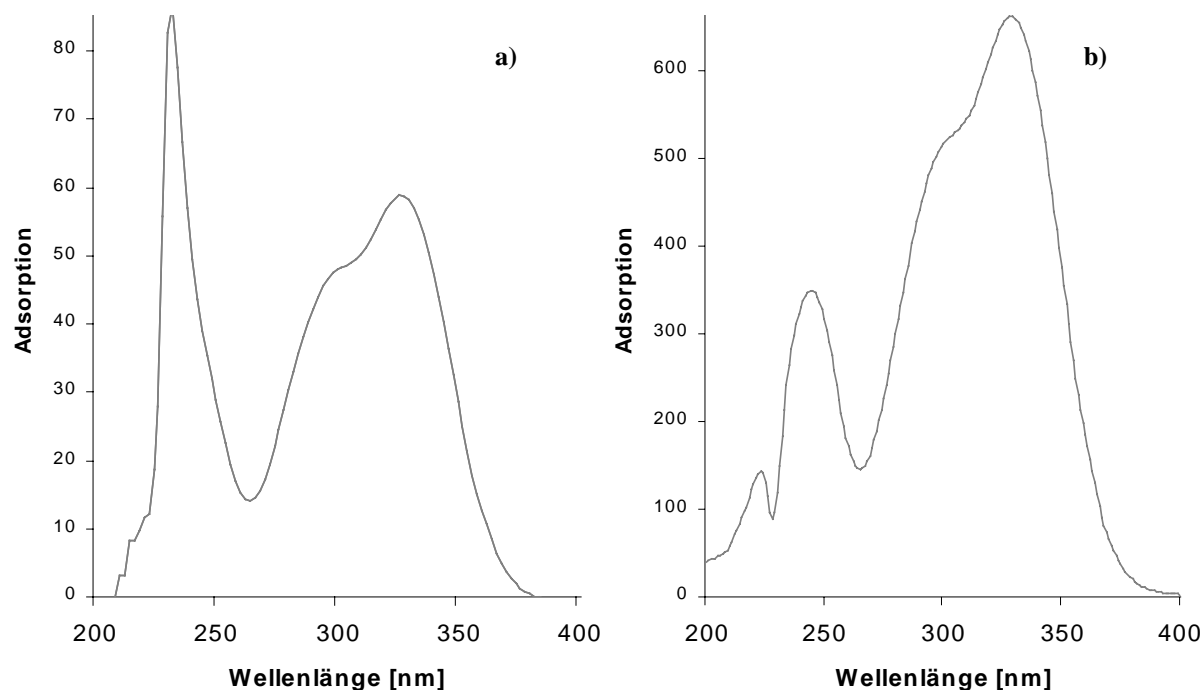


Abb. 48 UV-Spektrum der 5-Caffeoyl-Chinasäure (a) und der Substanz bei $R_t = 39,5$ min der Fraktion VI (b)

Hydroxyl- oder auch Carboxylfunktionen mit den Carbonyl- und Amidgruppen des Polyamids (Hörhammer und Wagner, 1959). Die Chlorogensäuren selbst treten aufgrund ihrer phenolischen Struktur und der freien Carboxyl-Funktion des Chinasäure-Restes stärker mit Polyamid in Wechselwirkung und werden durch Waschen mit Methanol nicht eluiert. Ihre Elution erfolgt erst mit angesäuertem Methanol (Winter und Herrmann, 1984). Daher ist zu vermuten, daß es sich hier um Chlorogensäure-Derivate handelt, die keine Carboxyl-Funktion tragen.

2.2.1.2 LC-ESI-MS Analyse

Um einen Einblick in die Struktur der Substanzen zu erhalten, werden LC-ESI-MS Analysen im positiven und negativen ESI-Mode durchgeführt. Es wird der unter 2.2.1.1 beschriebene Methanol/Essigsäure-Gradient verwendet. Die Fraktion VI wird von wenigen Ionenspuren dominiert. In Abb. 49 ist der Totalionenstrom der Fraktion VI und die Ionenspur der dominierenden Masse 359 m/z wiedergegeben. Die Tochterionenspektren der einzelnen

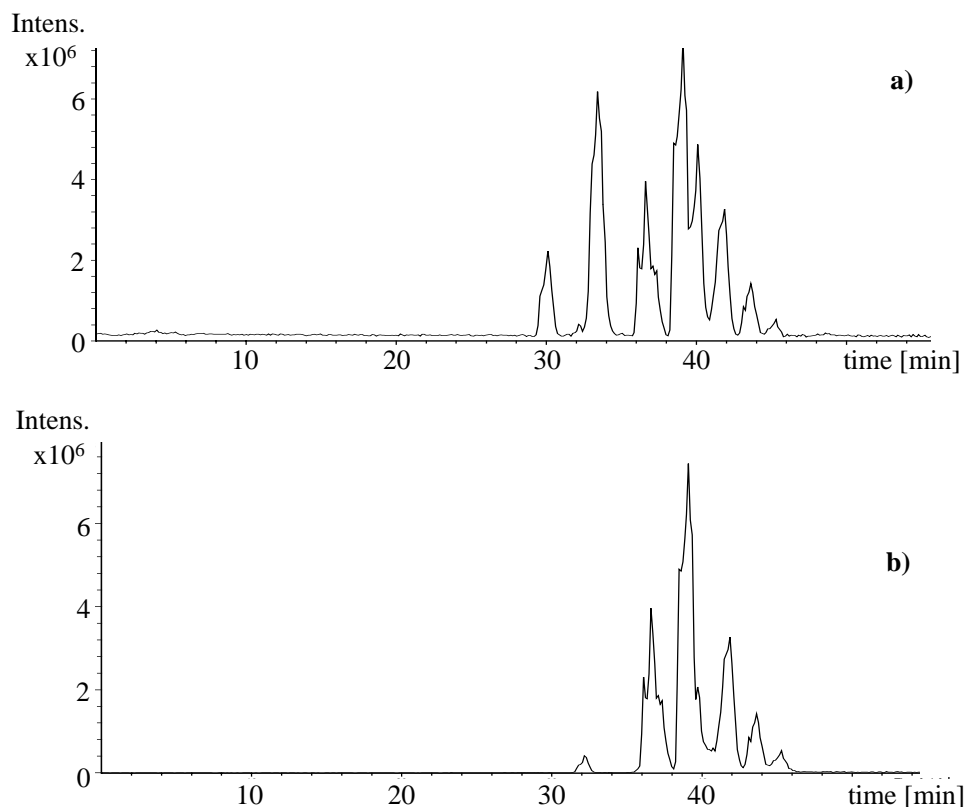


Abb. 49 Totalionenstrom der Fraktion VI der Sephadex G10 Fraktionierung (a) und die Ionenspur der Masse 359 m/z (b)

Signale der Masse 359 m/z sind identisch. Die Substanzen haben demnach alle eine ähnliche Struktur und es kann vermutet werden, daß es sich um Stellungen-Isomere einer Verbindung handelt. Stellungen-Isomere, wie die im Kaffee enthaltenen Caffeoyl-Chinasäuren 3-CQA, 4-CQA und 5-CQA unterscheiden sich bei einer LC-ESI-MS Analyse ausschließlich in den Retentionszeiten, nicht in ihren MS/MS-Spektren. Eine Identifizierung und Zuordnung der Isomere kann lediglich über Vergleich der Retentionszeiten mit Referenz-Substanzen erfolgen bzw. über Isolierung der Substanzen und Aufnahme von NMR-Spektren. Ein ähnliches Bild, wie hier für die Caffeoyl-Chinasäuren beschrieben, zeigt sich für die Signale in Fraktion VI. Die LC-ESI-MS Analysen im negativen ESI-Mode bestätigen dies, wobei der negative ESI-Mode infolge signifikanter Intensitätssteigerung besser geeignet ist. Die Fraktion VI wird von der Masse 335 m/z dominiert, die in mehreren Signalen auftritt und deren Retentionszeiten sich mit den Signalen der Masse 359 m/z decken. Die Massendifferenz deutet daraufhin, daß im positiven ESI-Mode nicht das $[M+H]^+$ -Molekülion detektiert wird, sondern sein Natrium-Addukt, während im negativen ESI-Mode das $[M-H]^-$ -Ion detektiert wird. Die Molekülmasse der Substanz liegt demzufolge bei 336 g/mol. Die

MS/MS-Spektren der einzelnen Isomeren sind bei negativer wie bei positiver Messung in Fragmentierungsmuster und Intensität identisch. In Abb. 50 sind die MS/MS-Spektren der Masse 335 m/z bei 36,5 und 39,5 min dargestellt. Die Molekülmasse von 336 g/mol liegt 18 Masseneinheiten unter der Masse von Caffeoyl-Chinasäure mit 354 g/mol. Aufgrund der UV-Spektren und ihrem Verhalten im MS sollte es sich bei den Substanzen um Caffeoyl-Chinasäurelactone handeln.

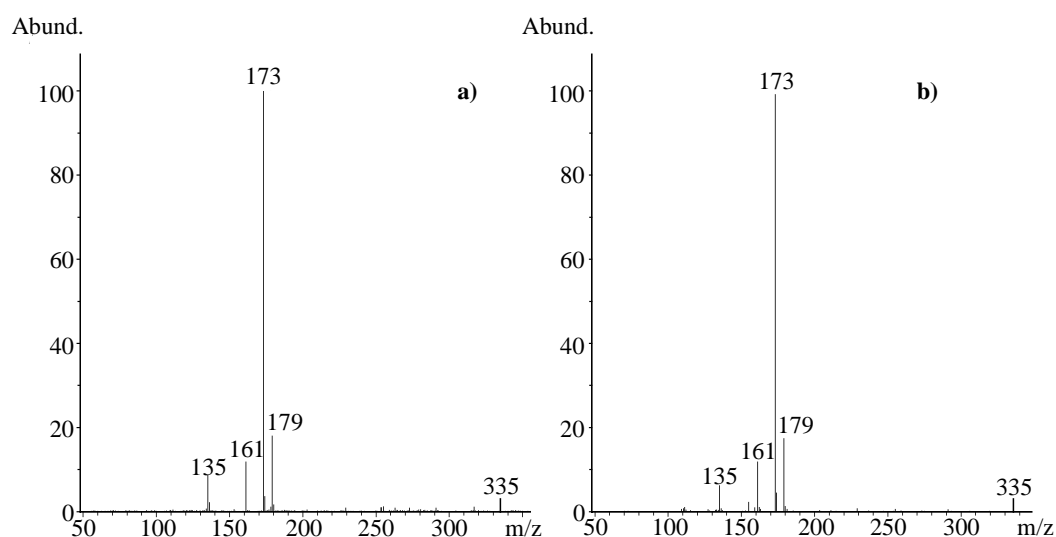


Abb. 50 MS/MS-Spektren (negativer ESI-Mode) der Substanzen mit der Masse 335 m/z der Fraktion VI der Sephadex Fraktionierung bei $R_t = 36,5$ (a) und $R_t = 39,5$ (b)

Die Bildung von Lactonen durch intramolekulare Veresterung der Chinasäure während des Röstprozesses ist bekannt. Bereits Hesse (1859) beobachtete, daß Chinasäure beim Erhitzen auf 220-250°C Wasser abspaltet und so ein Lacton (Chinid) bildet. Gorter (1911) konnte Chinasäurelactone aus Pyrolysaten von Chlorogensäuren isolieren. Kröplien (1963) sowie Sturm (1983) bestätigen diese Identifizierung. Hucke (1984) stellte die Bildung von Chinasäurelactonen aus Chinasäure und Chlorogensäure fest. Bei deren Quantifizierung in Röstkaffee zeigte sich eine signifikante Zunahme mit dem Röstgrad. Scholz-Böttcher und Maier (1991) identifizieren und quantifizieren eine Vielzahl an isomeren Chiniden in Röstkaffee, und Sturm (1983) beschreibt die Identifizierung von Chlorogensäurelactonen in Röstkaffee. Aus Modellröstungen von 5-CQA wurden drei Isomere isoliert, deren Struktur aber nicht näher bestimmt wurde. Bennat et al. (1994) identifizieren zwei dieser Isomere als 3-Caffeoyl- γ -Chinasäurelacton und 4-Caffeoyl- γ -Chinasäurelacton. Schrader et al. (1996) quantifizieren die Lactone und beobachten einen starken Anstieg der Gehalte mit

zunehmendem Röstgrad. In Handelskaffees finden sie Gehalte von 2,1 g/kg 3-CQL und 1,0 g/kg 4-CQL. Neben Caffeoyl-Chinasäurelactonen konnten Wynne et al. (1987) Feruloyl-Chinasäurelactone in Röstkaffee nachweisen; Angaben über deren Isomerie fehlen. Auch Kiehne (1996) konnte neben den Caffeoyl-Chinasäurelactonen die Massenspuren der Feruloyl-Chinasäurelactone im Röstkaffee nachweisen. Die LC-ESI-MS Analyse der Fraktion VII im negativen Mode zeigt bei 47-49 min eine Gruppe von Signalen mit der Feruloyl-Chinasäurelactonmasse $[M-H]^-$ 349 m/z und in den MS/MS-Spektren die typischen Abspaltungen der Ferulasäure (-193 m/z). Wie schon bei den Caffeoyl-Chinasäurelactonen treten auch hier mehrere Isomere auf (Chromatogramm siehe Anhang XV).

2.2.2 Modellröstung von Chlorogensäuren

Zur Absicherung der Identifizierung werden Referenz-Substanzen hergestellt. Die Lactonbildung aus Chlorogensäuren durch Erhitzen ist beschrieben (Bennat et al., 1994) und die Substanzen sollten demzufolge über Modellröstung von Chlorogensäuren leicht zugänglich sein. Feruloyl-Chinasäuren müssen, da sie nicht käuflich zu erwerben sind, vor der Modellröstung aus Rohkaffee isoliert werden (siehe Material und Methoden). 5-CQA bzw. die isolierten FQA-Isomere werden für 7 min bei 290°C Ofentemperatur geröstet. Es wird mit heißem Wasser extrahiert und der gefriergetrocknete Extrakt mittels LC-ESI-MS und UV bei 325 nm analysiert.

2.2.2.1 Modellröstung der 5-CQA

2.2.2.1.1 LC-ESI-MS Analyse

Im Chromatogramm treten die Caffeoyl-Chinasäurelactone bei 38-40 min auf (siehe Abb. 51). Bei 30 min eluiert 5-Caffeoyl-Chinasäure. Das Signal bei 52 min mit einer Molekülmasse von 516 g/mol ist im ersten Augenblick überraschend. Bei Betrachtung des MS/MS-Spektrums zeigt sich vom Molekülion ausgehend die Abspaltung von Kaffeesäure. Beim Vergleich mit den MS/MS-Spektren der aus Rohkaffee isolierten 3,4-diCaffeoyl-Chinasäure kann die Substanz als diCaffeoyl-Chinasäure identifiziert werden (siehe Abb. 52). Durch die Röstung kommt es demnach unter den verwendeten Röstbedingungen primär zu Dehydrierungen und intramolekularen Cyclisierungen zu mehreren stellungsisomeren Lactonen, wie in der Literatur beschrieben (Bennat et al., 1994). Ferner treten Isomerisierungen infolge Hydrolyse

der Esterbindung zwischen Chinasäure und Kaffeesäure und Neuknüpfung an anderer Stelle im Molekül bzw. an einem weiteren 5-CQA-Molekül auf, was in geringem Umfang auch zur Bildung von diCaffeoyl-Chinasäuren führt.

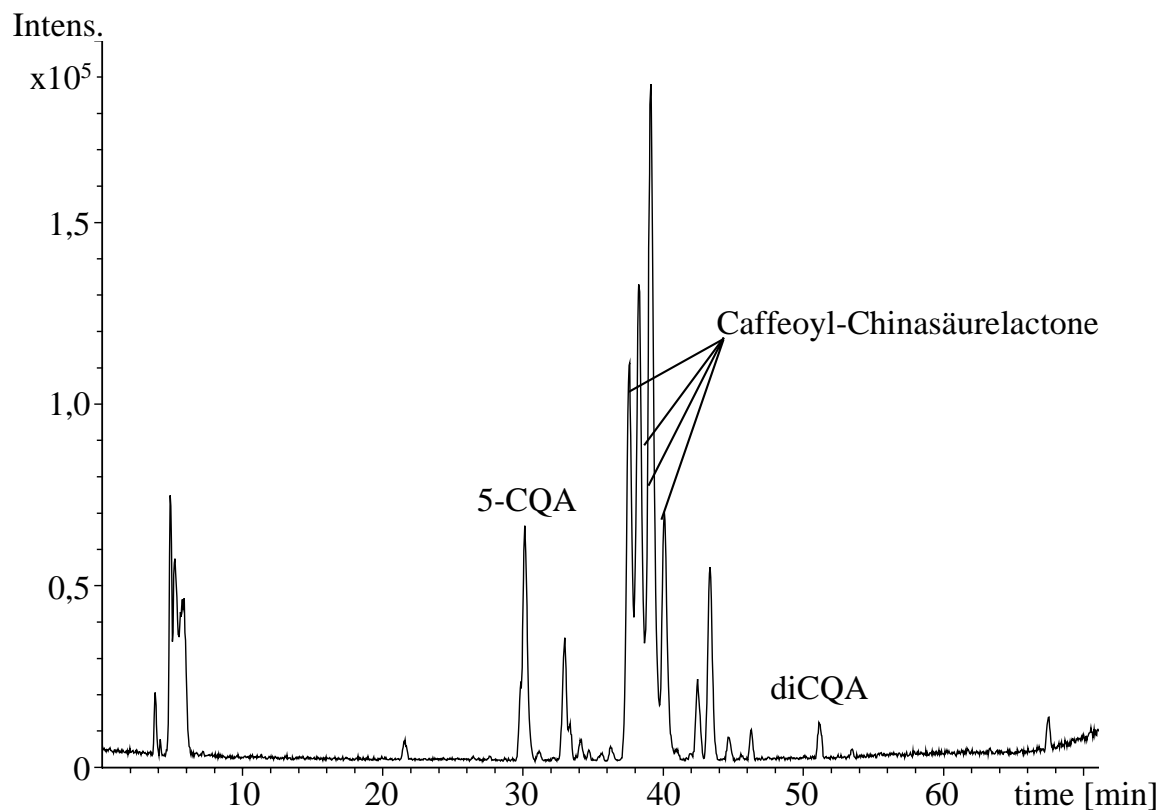


Abb. 51 Totalionenstrom des Heißwasserextrakts der 5-CQA Röstung

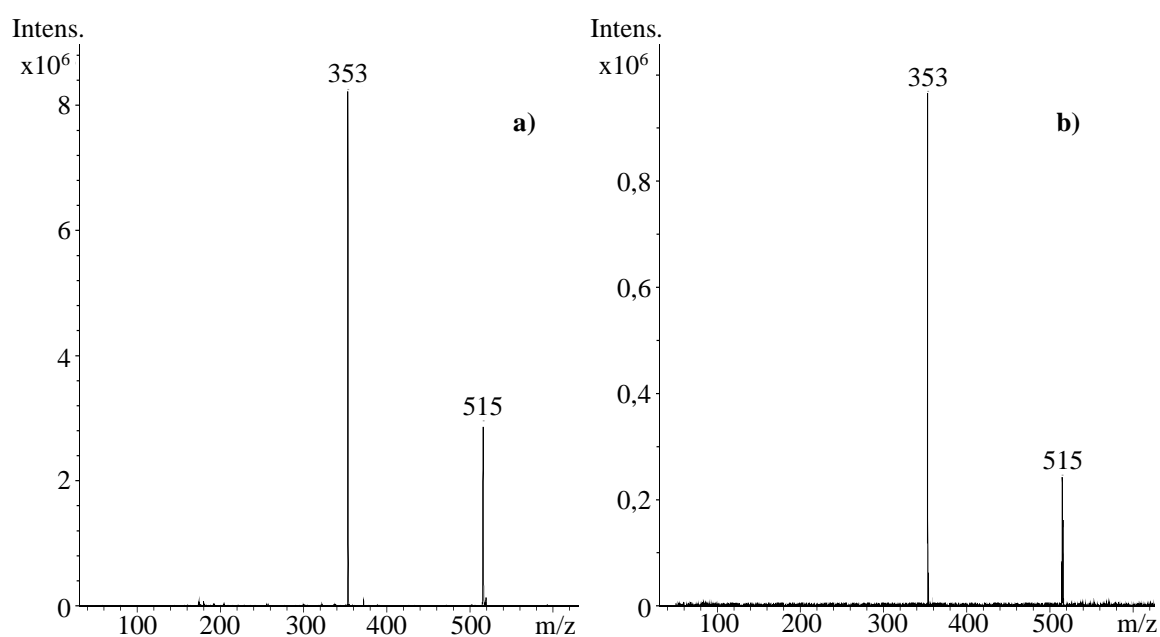


Abb. 52 MS/MS-Spektren (negativer ESI-Mode) von 3,4-diCQA aus Rohkaffee isoliert (a) und Peak IV bei 52 min (b) (vgl. Abb. 51)

2.2.2.1.2 Präparative Isolierung der Lactone

Zur Strukturaufklärung werden die Lactone präparativ aus der Modellröstung isoliert. Mittels semipräparativer RP-HPLC gelingt die Abtrennung der Lactone von den anderen Röstprodukten. Mit der bereits für die Isolierung der Feruloyl-Chinasäuren aus Rohkaffee verwendeten RP-18 Nucleosil Säule (siehe Material und Methoden) wird mit einem Methanol/Essigsäure-Gradienten die in Abb. 53 dargestellte Trennung erzielt, mit den nicht weiter aufgetrennten Caffeoyl-Chinasäurelactonen bei 30 min.

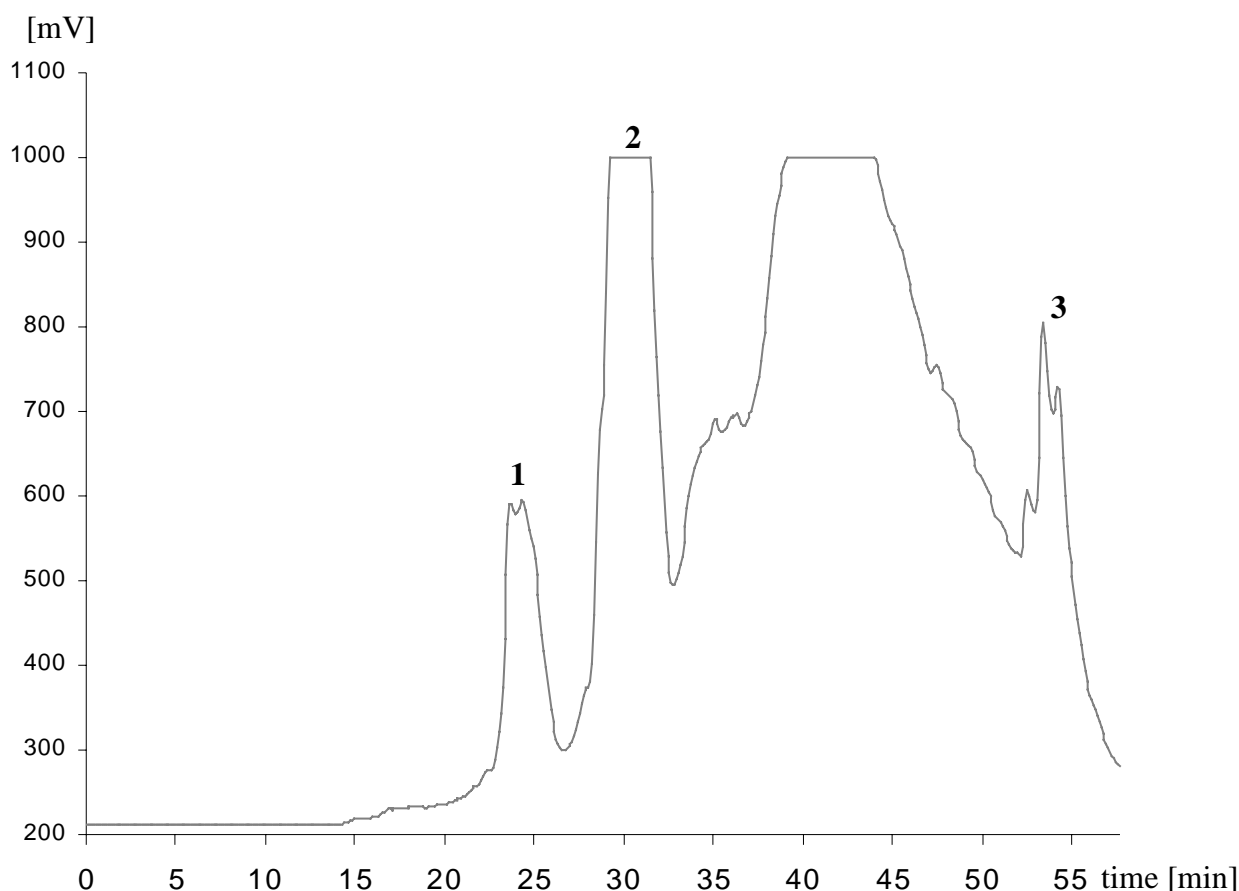


Abb. 53 UV-Chromatogramm der semipräparativen Trennung des Heißwasserextrakts der 5-CQA-Modellröstung bei 324 nm; 5-CQA (1), Lacton-Fraktion (2), diCQAs (3)

Die Trennung der einzelnen Isomere erfolgt mittels analytischer HPLC. Mit der bisher verwendeten RP-18 Nucleosil Säule konnte keine ausreichende Trennung erreicht werden, sodaß auf ein alternatives Säulenmaterial zurückgegriffen und eine Phenyl-Hexyl-Phase mit einem Methanol/Wasser-Gradienten eingesetzt wurde. Bei isokratischer Arbeitsweise konnte

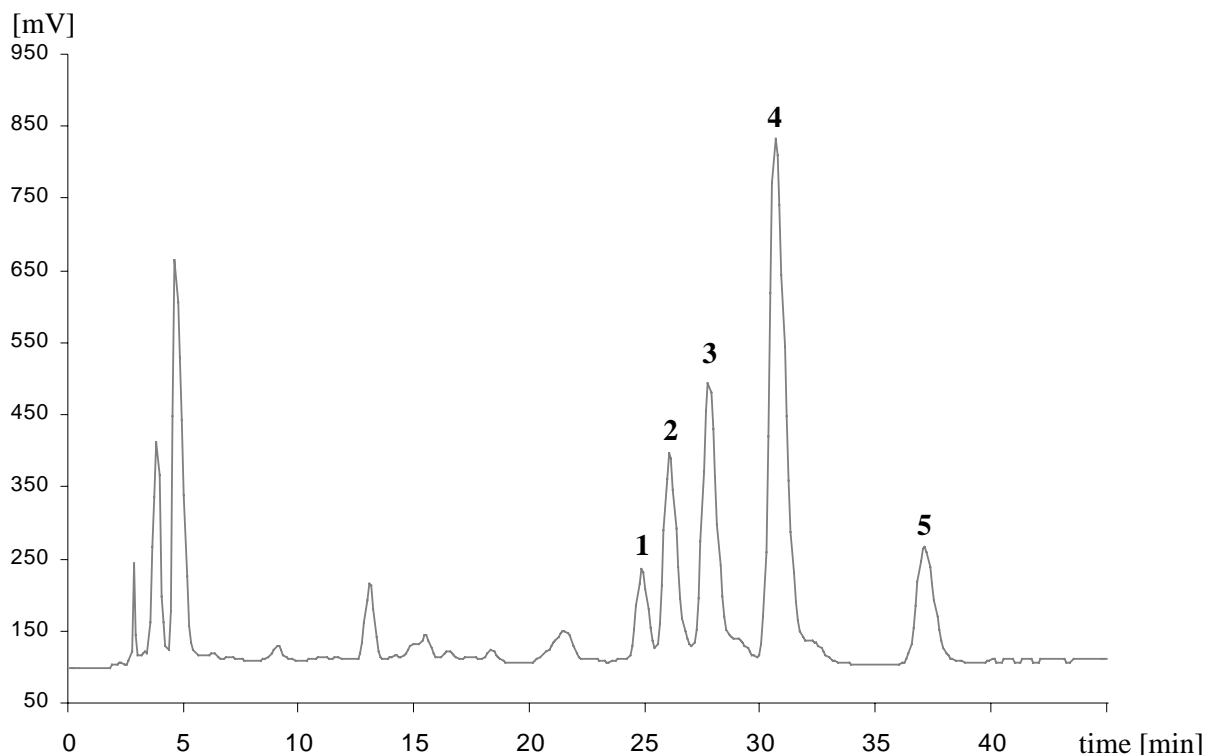


Abb. 54 UV-Chromatogramm der Lacton-Fraktion bei 324 nm an einer Phenyl-Hexyl-Phase aus der 5-CQA Modellröstung; isomere Caffeoyl-Chinasäurelactone (Signale 1-5)

die in Abb. 54 dargestellte Trennung erreicht und die Substanzen in für die Strukturaufklärung ausreichender Menge isoliert werden.

2.2.2.1.3 Strukturaufklärung und postulierter Bildungsmechanismus der einzelnen Caffeoyl-Chinasäurelacton-Isomere

Die Struktur der isolierten Isomere wird über NMR-spektroskopische Methoden aufgeklärt. Als Anhaltspunkt wird ein ^1H -NMR-Spektrum der eingesetzten 5-Caffeoyl-Chinasäure aufgenommen. Die Daten aller fünf Isomere sowie der 5-CQA finden sich in Anhang XVI.

Die Isomere zwei und fünf (siehe Abb. 54) konnten als 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid identifiziert werden, die bereits von Kiehne (1996) aus der Modell-Reaktion von 5-Caffeoyl-Chinasäure isoliert wurden. Entgegen den Daten von Kiehne entstehen die Lactone unter den hier verwendeten Röstbedingungen nicht als Haupt-Isomere. Vielmehr bilden die Isomere drei und vier (siehe Abb. 54) die quantitativ dominierenden Isomere in der Modellröstung. In Abb. 55 ist das ^1H -NMR-Spektrum des vierten Isomers (siehe Abb. 54) wiedergegeben. Die Analyse der Signalstruktur und der Kopplungskonstanten

bestätigen die Struktur der Substanz als 5-Caffeoyl- δ -Chinid. Verbindung drei (siehe Abb. 54) kann über sein ^1H -NMR-Spektrum als 5-Caffeoyl- γ -Chinid identifiziert werden (Daten siehe Anhang XVI). Bei Verbindung eins ($R_t = 25,5$ min) reicht die isolierte Menge nicht zur Strukturaufklärung. Das ^1H -NMR läßt aber auf ein weiteres konformeres γ -Lacton wahrscheinlich mit Kaffeesäure in 5-Position am Lactonring schließen.

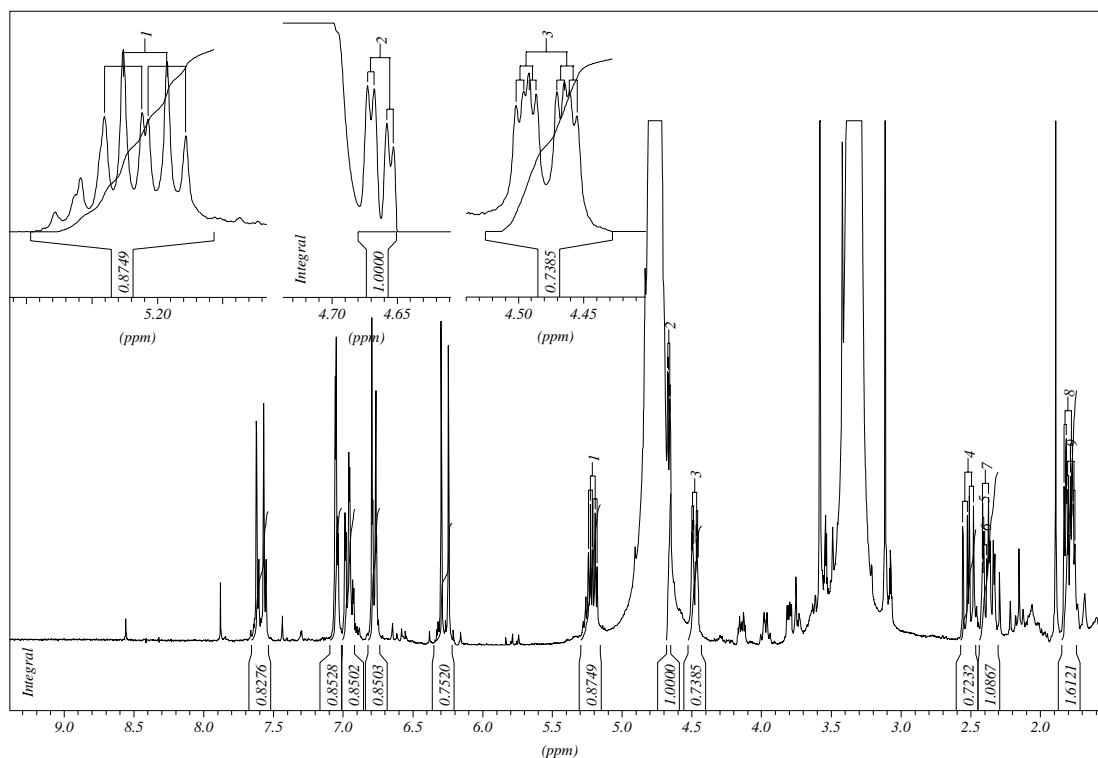


Abb. 55 ^1H -NMR-Spektrum des 5-Caffeoyl- δ -Chinids

Die intramolekulare Dehydrierung der 5-Caffeoyl-Chinasäure zu den verschiedenen Lactonen kann nicht ohne Konformationsänderung bzw. ohne Umlagerung des Moleküls erfolgen. Bei Raumtemperatur liegt die eingesetzte 5-Caffeoyl-Chinasäure in (-)-Konfiguration vor, die Carboxyl-Funktion demnach in äquatorialer Stellung am C1-Atom, die OH-Gruppe an C3 axial, am C4 äquatorial und die Kaffeesäure am C5 ebenfalls äquatorial (Corse et al., 1966; Clifford, 1985). Ein intramolekularer Ringschluß zum Lacton ist in dieser Konformation weder zu einem γ - noch zu einem δ -Lacton möglich. Für den Ringschluß zu den von Kiehne (1996) beschriebenen 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid ist neben einer Konformationsänderung eine Isomerisierung der 5-Caffeoyl-Chinasäure zur 3- bzw. 4-Caffeoyl-Chinasäure nötig, d.h. es muß eine Esterbindung geöffnet und eine neue an der

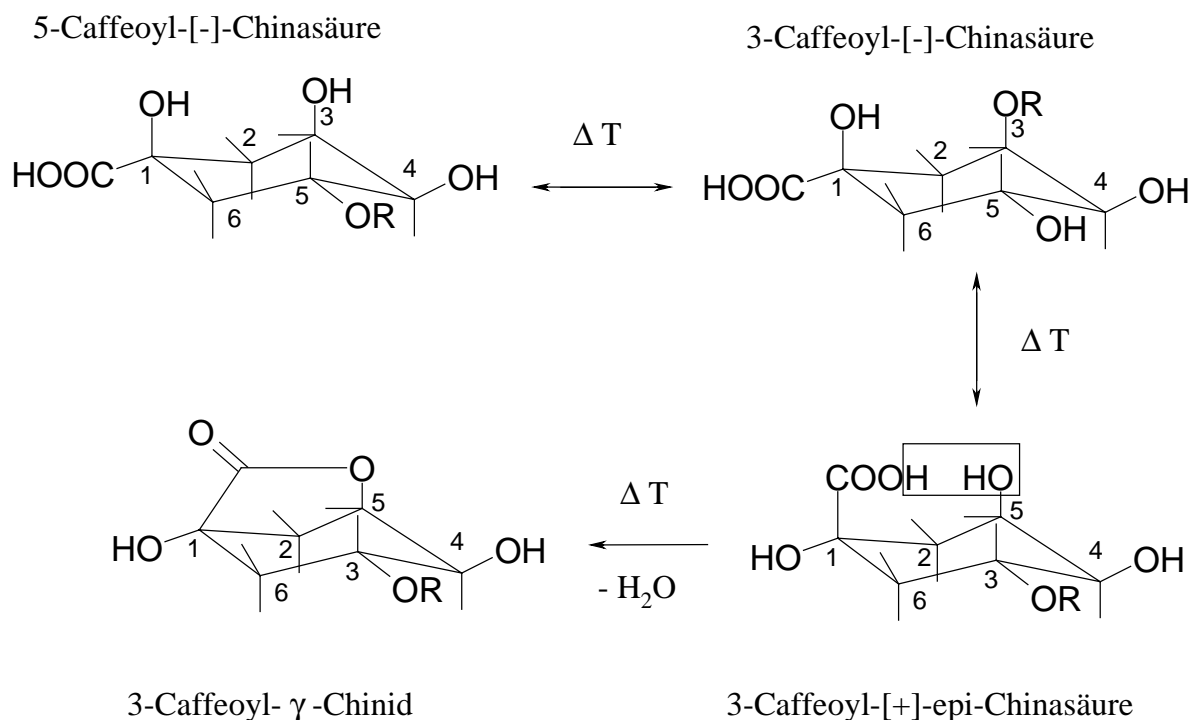


Abb. 56 Konformationsänderung nach Umlagerung der 5-CQA zur 3-CQA
und Bildung des 3-Caffeoyl- γ -Lactons (Clifford, 1985; Kiehne, 1996)

C3- bzw. C4-Position der Chinasäure geknüpft werden. Entsprechende Isomerisierungen sind in der Literatur beschrieben (Trugo und Macrae, 1984; Held, 1991; Leloup et al., 1995) und auch der Nachweis von diCaffeoyl-Chinasäuren in der 5-CQA-Modellröstung bestätigt dies. Nach Neuknüpfung der Esterbindung an der OH-Gruppe am C3 bzw. C4 der Chinasäure kommt es zu einer Konformationsänderung unter Bildung der 3- bzw. 4-Caffeoyl(-)-epi-Chinasäure und anschließender Dehydrierung zum 3-Caffeoyl- γ -Chinid oder 4-Caffeoyl- γ -Chinid wie in Abb. 56 verdeutlicht.

Im Gegensatz dazu ist für die Bildung des 5-Caffeoyl- δ -Chinids bzw. des 5-Caffeoyl- γ -Chinids lediglich eine Konformationsänderung der 5-Caffeoyl(-)-Chinasäure zur 5-Caffeoyl-neo-Chinasäure bzw. 5-Caffeoyl-(+)-epi-Chinasäure nötig. In dieser Konformation steht die Carboxylfunktion am C1 und die OH-Gruppen am C3 bzw. C4-Atom der Chinasäure in axialer Stellung und eine intramolekulare Dehydrierung zum Lacton kann erfolgen, wie in Abb. 57 veranschaulicht.

Solche Konformationsänderungen sind für Chinasäure während der Kaffeeröstung beschrieben (Scholz-Böttcher, 1991). Scholz-Böttcher konnte ausgehend von (-)-Chinasäure die Bildung von acht stereoisomeren Chinasäuren, darunter (+)-Chinasäure, (-)-epi-

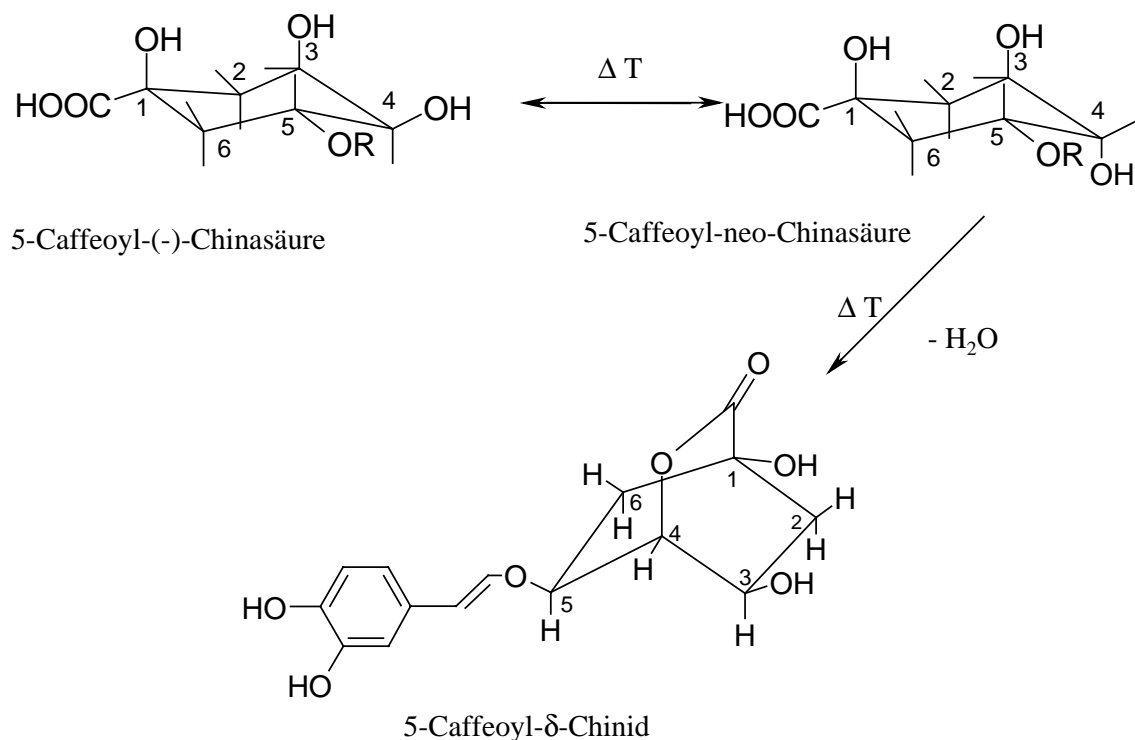


Abb. 57 postulierter Bildungsmechanismus für das 5-Caffeoyl- δ -Chinids aus der 5-Caffeoyl-(-)-Chinasäure

Chinasäure und neo-Chinasäure durch thermische Belastung beobachten, und identifizierte ferner zwölf Chinide, darunter vier Paare an enantiomeren γ -Chiniden sowie vier δ -Chinide. Legt man den dargestellten Bildungsmechanismus zugrunde, ist das Auftreten des 5-Caffeoyl- δ -Chinids bzw. des 5-Caffeoyl- γ -Chinids als Haupt-Isomere der 5-Caffeoyl-(-)-Chinasäure-Modellröstung nicht weiter verwunderlich. Im Gegensatz zur Bildung von 3-Caffeoyl- γ -Lacton oder 4-Caffeoyl- γ -Lacton ist keine Umlagerung im Molekül nötig, lediglich eine Konformationsänderung. Es ist aber zu erwarten, daß es bei fortschreitender Röstdauer zu einer Verschiebung des Isomeren-Verhältnisses zugunsten der thermisch stabileren γ -Lactone kommt, wie es bereits von Kiehne für die einzelnen γ -Lactone beobachtet wurde (Kiehne, 1996). Insbesondere für 5-Caffeoyl- δ -Chinid ist ein Abbau bei fortschreitender Röstung anzunehmen, da der Ring im Gegensatz zu den γ -Lactonen unter starker Spannung steht und die Substanz thermisch weit weniger stabil sein sollte.

2.2.2.2 Modellröstung der Feruloyl-Chinasäure-Isomere und präparative Isolierung der Lactone

Die aus Rohkaffee isolierten Feruloyl-Chinasäuren (siehe Material und Methoden) werden entsprechend der 5-CQA einer Modellröstung unterzogen, extrahiert und über LC-ESI-MS vermessen. Die Feruloyl-Chinasäurelactone treten auch hier als primäre Reaktionsprodukte hervor. Die Lacton-Fraktion wird zuerst über semipräparative RP-HPLC isoliert und die einzelnen Isomere über analytische RP-HPLC an einer Phenyl-Hexyl-Phase getrennt (Chromatogramm siehe Abb. 58). In für die Strukturaufklärung ausreichender Menge konnten lediglich die Signale bei 25,1 und 30,0 min isoliert werden. Diese zeigten bei der spektroskopischen Analyse die den Caffeoylel-Chinasäurelactonen 3-Caffeoylel- γ -Lacton und 4-Caffeoylel- γ -Lacton (siehe 2.2.2.1) entsprechende Signale, mit einem zusätzlichen Singulett der Methoxy-Gruppe der Ferulasäure bei 3,85 ppm, und können damit als 3-Feruloyl- γ -Chinid und 4-Feruloyl- γ -Chinid identifiziert werden. Die spektroskopischen Daten sind in Anhang XVII zusammengestellt. Es zeigt sich also eine von der 5-CQA Modellröstung abweichende Isomerenverteilung. Diese Beobachtung lässt sich mit der eingesetzten Isomeren-Mischung an

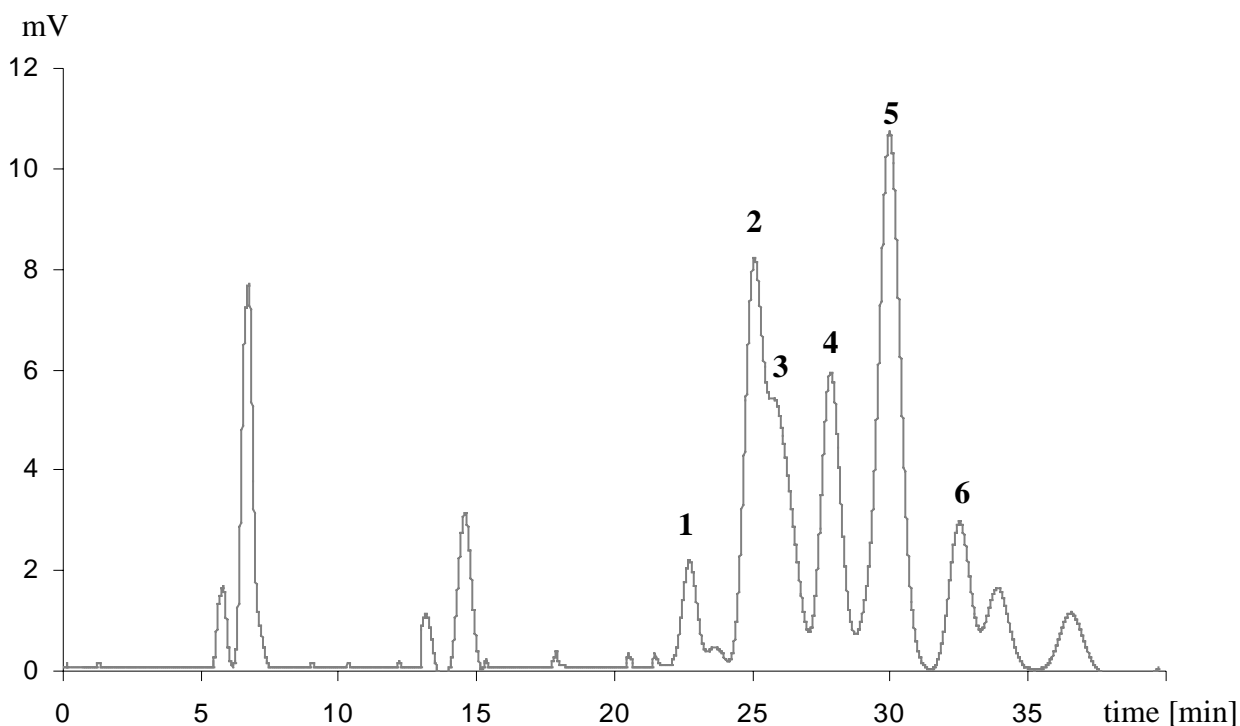


Abb. 58 UV-Chromatogramm der Lacton-Fraktion bei 324 nm aus der 5-FQA Modellröstung; 1-6 isomere Feruloyl-Chinasäurelactone

Feruloyl-Chinasäuren begründen. Während für die Modellröstung der Caffeoyl-Chinasäure reine 5-CQA eingesetzt wurde, wurde hier ein Isomerengemisch aus 3-, 4- und 5-Feruloyl-Chinasäure verwendet, deren Röstung eine gänzlich andere Isomerenverteilung bedingt, mit höheren Gehalten an den thermisch stabileren 3-FQL und 4-FQL, die aus 3-FQA und 4-FQA direkt ohne Umlagerung des Moleküls gebildet werden können.

2.2.2.3 Weitere Modellversuche

Ferner wurden einzelne Modellröstungen mit diCaffeoyl-Chinasäuren, Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäuren bzw. den isolierten Rohkaffee-Proteinen (siehe 2.1.1) durchgeführt. Bei der LC-ESI-MS Analyse der Extrakte konnten die Signale der Caffeoyl-Chinasäurelactone bzw. der Feruloyl-Chinasäurelactone nachgewiesen werden. Da freie Caffeoyl- bzw. Feruloyl-Chinasäure in den Röstansätzen nicht enthalten war, kann davon ausgegangen werden, daß es durch Abbau der o.g. Verbindungen zur Lacton-Bildung kommt. Im Falle der diCQA bzw. Feruloyl-Caffeoyl-Chinasäure ist dies nicht weiter überraschend und deckt sich mit den Ergebnissen der 5-CQA-Röstung (siehe 2.2.2.1). Bei den gerösteten Rohkaffee-Proteinen hat die leicht grünliche Färbung bereits die Anwesenheit von gebundenen Chlorogensäuren vermuten lassen (siehe 2.1.1), was durch den Nachweis von Chlorogensäurelactonen bestätigt wird.

2.2.3 Nachweis von Chlorogensäurelactonen in Röstkaffee

2.2.3.1 Alternative Fraktionierung

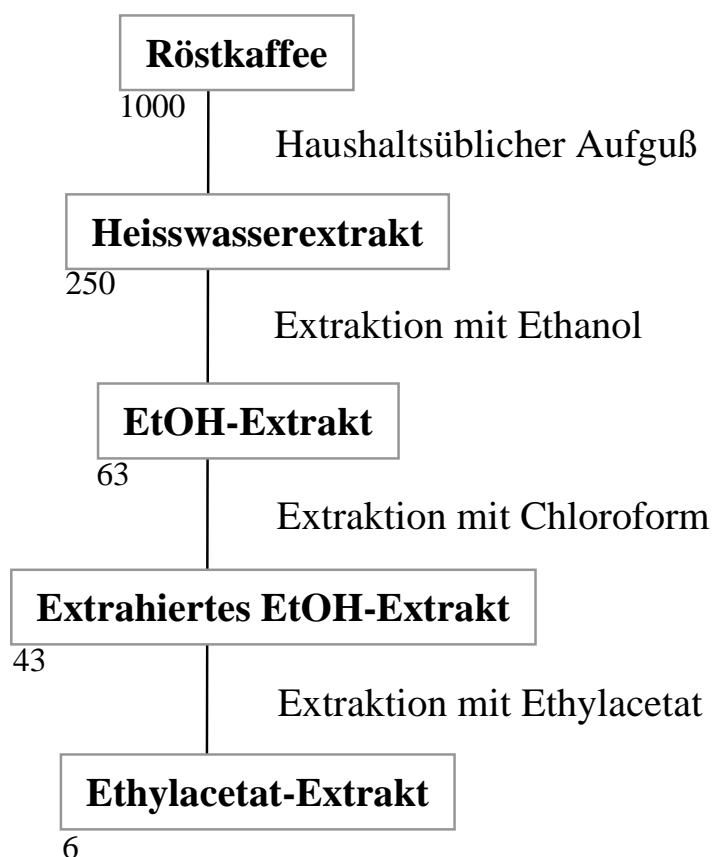


Abb. 59 Alternative Fraktionierung zur Isolierung der Chlorogensäurelactone aus Röstkaffee und mittlere Ausbeuten [mg] bezogen auf 1 g Röstkaffee

Die LC-MS Analysen der Fraktion VI und der Fraktion VII der Sephadex G10 Fraktionierung des Methanol-Eluats der Polyamidsäule (siehe 2.2.1) deuten auf die Anwesenheit von mehreren Caffeoyl- und Feruloyl-Chinasäurelacton-Isomeren im Röstkaffee hin. Zur Strukturaufklärung werden die Substanzen präparativ isoliert. Da die Aufarbeitung nach Chen (1979) ausgesprochen zeitaufwendig ist, wurde nach einer alternativen Methode gesucht. Mit der in Abb. 59 dargestellten Vorgehensweise konnten die Lactone wesentlich schneller angereichert werden. Abb. 60 zeigt das Chromatogramm der LC-ESI-MS Analyse des erhaltenen Ethylacetat-Extraktes. Die Signale von 37 bis 44 min können den Caffeoyl-Chinasäurelactonen, die bei 48-50 min den Feruloyl-Chinasäurelacton-Isomeren zugeordnet werden.

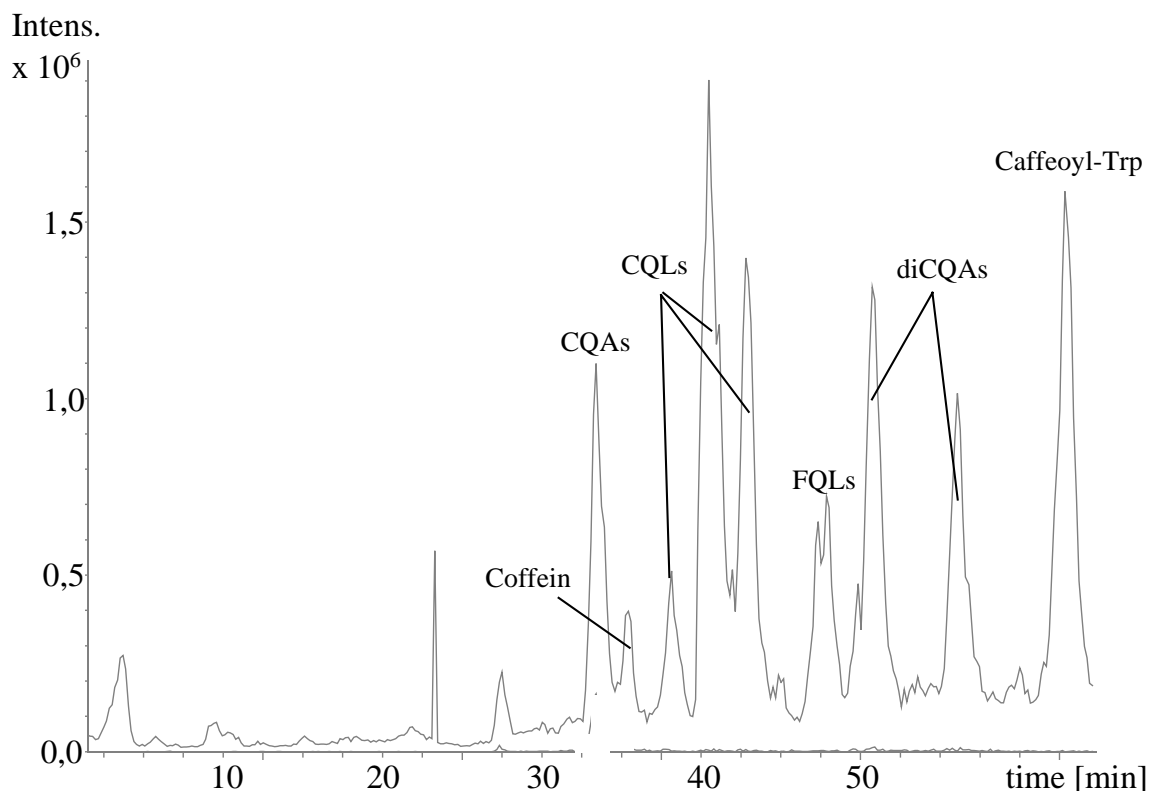


Abb. 60 Totalionenstrom des Ethylacetat-Extrakts der alternativen Röstkaffee-Aufarbeitung

2.2.3.2 Präparative Isolierung der Chlorogensäurelactone aus Röstkaffee

Zur Isolierung der Lactone aus dem Ethylacetat-Extrakt wird die Trennung auf eine semipräparative Säule übertragen (siehe Material und Methoden) und die Lacton-Fractionen in präparativer Menge isoliert. Neben den Lactonen werden auch die anderen Hauptverbindungen des Ethylacetat-Extraktes isoliert und über MS vermessen. Die Isomere der einzelnen Chlorogensäuren, sowie Caffeoyl-Tryptophan können so identifiziert werden (detaillierte Übersicht siehe Anhang XVIII).

Die Trennung der Lactone wird erneut an Phenyl-Hexyl-Material bei 325 nm durchgeführt (siehe 2.2.1). In Abb. 61 ist die UV-Spur einer Trennung der Caffeoyl-Chinasäurelacton-Isomere wiedergegeben. Beim Vergleich der Retentionszeiten mit den aus der Modellröstung isolierten Isomeren können die Signale 1 und 4 (Abb. 61) als 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid identifiziert werden. Die Verbindungen wurden bereits von Kiehne (1996) in Röstkaffee nachgewiesen. Bei Signal 2 und 3 (siehe Abb. 61) handelt es sich nach

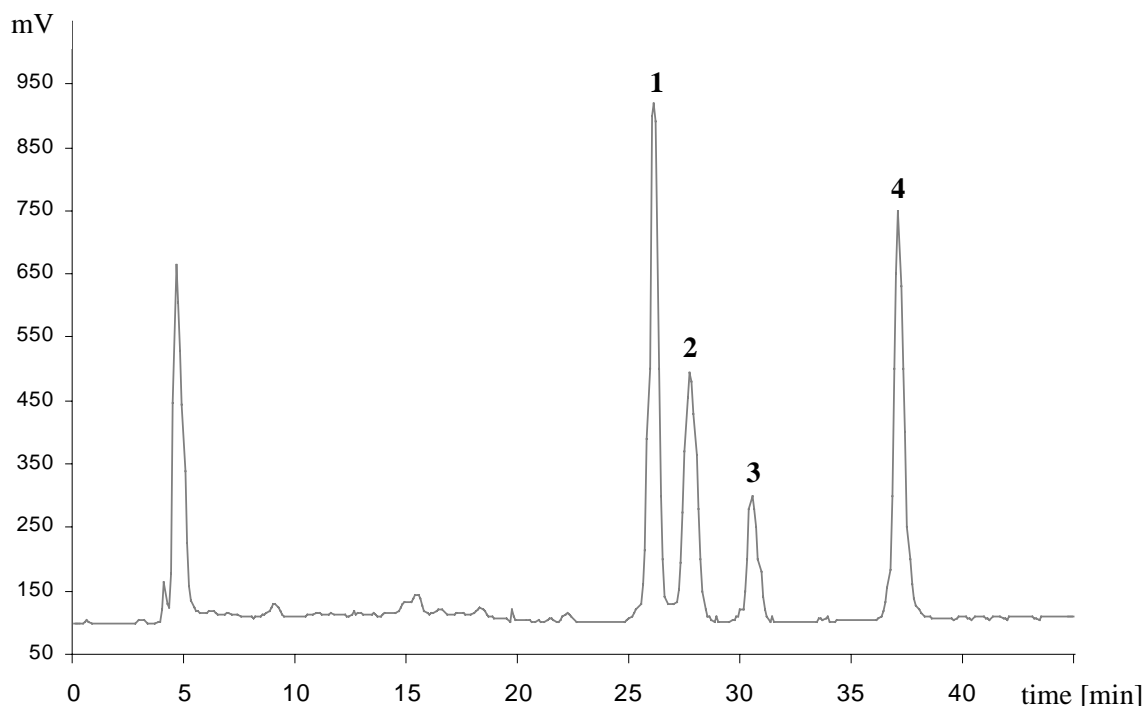


Abb. 61 Trennung der Caffeoyl-Chinasäurelacton-Fraktion an einer Phenyl-Hexyl-Phase bei 324 nm

dem Retentionszeitenvergleich mit den aus der Modellröstung der 5-CQA isolierten Verbindungen (siehe 2.2.2) um 5-Caffeoyl- γ -Lacton und 5-Caffeoyl- δ -Lacton. Die ^1H -NMR Spektren der isolierten vier Caffeoyl-Chinasäure-Isomere bestätigen die Identifizierung. Die Signale und das Aufspaltungsmuster deckt sich mit den aus der Modellröstung isolierten Lactonen (siehe Anhang XVII).

Im Falle der Feruloyl-Chinasäurelactone zeigt sich ein ähnliches Bild. Erneut sind im Röstkaffee mehrere Haupt-Isomere enthalten. Im Gegensatz zu den Caffeoyl-Chinasäurelactonen treten hier mehrere Isomere hervor, mit 3-Feruloyl- γ -Chinid und 4-Feruloyl- γ -Chinid als Hauptverbindungen. Erneut kann die Isomerenzuordnung durch die ^1H -NMR Spektren der isolierten Verbindungen bestätigt werden (siehe Anhang XVIII).

2.2.3.3 Schlußfolgerung

Der Nachweis von 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid im Röstkaffee bestätigt die Identifizierung nach Kiehne (1996). Obwohl die Bildung dieser Lactone aus der im Rohkaffee mengenmäßig dominierenden 5-Caffeoyl-Chinasäure nur durch Umlagerung zu 3- und 4-Caffeoyl-Chinasäure und anschließender Konformationsänderung zur 3- bzw. 4-Caffeoyl-(-)-epi-Chinasäure möglich ist (siehe 2.2.2), bilden die Verbindungen die Haupt-Isomere der im Röstkaffee nachgewiesenen Caffeoyl-Chinasäurelactone. Hingegen treten das aus 5-Caffeoyl-Chinasäure direkt über eine Konformationsänderung zugängliche 5-Caffeoyl- δ -Chinid und das 5-Caffeoyl- γ -Chinid in deutlich geringerer Konzentration hervor. Dies kann zum einen mit ihrer geringeren thermischen Stabilität als auch mit der Isomerisierung der Lactone während des Röstprozesses zu den stabileren 3- und 4-CQL Isomeren begründet werden. Ferner können die im Rohkaffee vorhandenen 3- und 4-Caffeoyl-Chinasäuren direkt die stabileren 3-Caffeoyl- γ - und 4-Caffeoyl- γ -Chinide bilden.

Der Nachweis der Feruloyl-Chinasäurelactonen bestätigt die Daten von Kiehne (1996) und Wynne et al. (1987). Mit 3-Feruloyl- γ -(-)-Chinid und 4-Feruloyl- γ -(-)-Chinid als Haupt-Isomeren dominieren dieselben Isomere wie bei den Caffeoyl-Chinasäurelactonen. Die genannten Bildungsmechanismen (siehe 2.2.2) gelten hier analog. Auch die diCaffeoyl- und Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäuren sowie die an Rohkaffee-Proteine gebundenen Chlorogensäuren beeinflussen das Isomerenmuster der Chlorogensäurelactone im Röstkaffee. Sie werden während der Röstung abgebaut und bilden so ebenfalls Lactone (siehe 2.2.2.3).

Damit konnten die Chlorogensäure-Lactone als Hauptverbindungen des bitteren Methanol-Eluats der Polyamidsäule identifiziert werden (siehe 2.1.3.1).

2.2.4 Sensorische Analyse der Chlorogensäurelactone

Die Chlorogensäurelactone bilden die Hauptverbindungen des bitteren Methanol-Eluats der Polyamidsäule. Es liegt daher nahe zu vermuten, daß sie als Bitterstoffe fungieren. Aus diesem Grund werden sensorische Analysen des Heißwasserextrakts der 5-Caffeoyl-Chinasäure-Modellröstung und der isolierten Lacton-Fraktion durchgeführt. In Tab. 13 sind die Ergebnisse der durchgeführten Verkostungen aufgeführt.

Tab. 13 Bitterkeits-Erkennungsschwellenwerte des Heißwasserextrakts der 5-Caffeoyl-Chinasäure-Modellröstung und der daraus isolierten Lacton-Fraktion

Verkostete Fraktion	Bitterkeits-Erkennungsschwellenwert [mg/L]
Heißwasserextrakt der 5-CQA-Modellröstung	53
Lacton-Fraktion	19

Sowohl der Heißwasserextrakt als auch die Lacton-Fraktion entfalten demnach eine intensive Bitterkeit. Den Ergebnissen zufolge sind die Lactone als Bitterstoffe mit Schwellenwerten von im Mittel 20 mg/L einzustufen. Eine Verkostung der einzelnen Isomere konnte nicht erfolgen, da die isolierten Mengen der Reinsubstanzen aus den Modellröstungen für eine sensorische Analyse nicht ausreichten. Der erhaltene Bitterkeits-Erkennungsschwellenwert kann daher nur als Richtwert für die Chlorogensäurelactone generell angesehen werden.

Kiehne (1996) bestimmt die Gehalte für 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid in Handelskaffee mit 84 mg/L für 3-CQL und 40 mg/L für 4-CQL (bei einem Aufguß von 50 g/L). Damit liegt die Konzentration signifikant über der Bitterkeits-Erkennungsschwelle von 20 mg/L und die Lactone tragen im Röstkaffee zur wahrnehmbaren Bitterkeit bei. Ferner beobachtete Kiehne (1996) eine stetige Zunahme der Lactone mit fortschreitender Röstung, wie in Abb. 62 veranschaulicht. Damit ist zusätzlich eine positive Korrelation der Chlorogensäurelacton-Gehalte mit der Entwicklung der wahrnehmbaren Gesamtbitterkeit im Röstkaffee festzustellen.

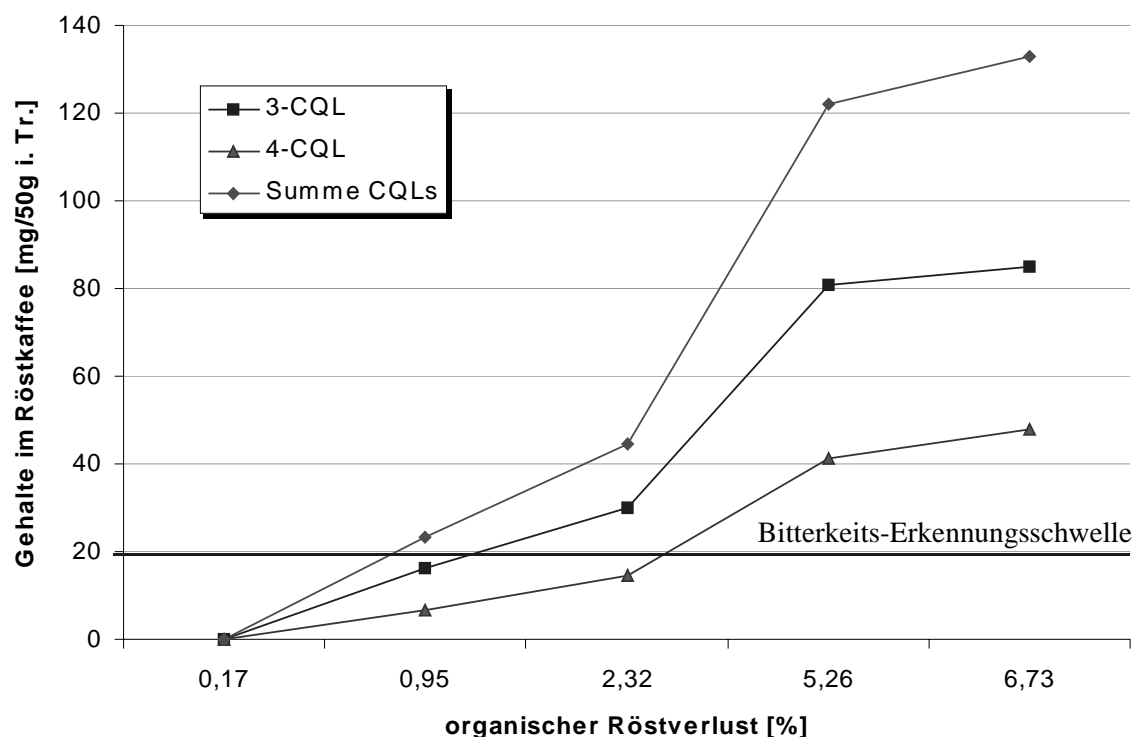


Abb. 62 Entwicklung der Caffeoyl-Chinasäurelactone während der Kaffeeröstung;
Daten nach Kiehne (1996)

2.2.5 Nachweis weiterer Chlorogensäure-Derivate

2.2.5.1 LC-ESI-MS Analyse

Neben den Chlorogensäurelactonen finden sich im Totalionenstrom der einzelnen Fraktionen weitere bisher nicht identifizierte Ionenspuren, die wie die Chlorogensäurelactone in mehreren Signalen auftreten. In Abb. 63 ist der TIC der Sephadex Fraktion VI, die Ionenspur der Caffeoyl-Chinasäurelactone (359 m/z) und die Ionenspur 391 m/z wiedergegeben.

Die Masse 391 m/z dominiert zusammen mit den Caffeoyl-Chinasäurelactonen die Fraktion und zeigt wie die Lactone eine starke UV-Absorption bei 325 nm. Die MS/MS-Spektren weisen ein Fragmentierungsmuster mit einer 162 m/z-Abspaltung auf, die zusammen mit der starken UV-Absorption für Kaffeesäure-haltige Substanzen spricht. Im negativen ESI-Mode zeigt sich eine Masse von 367 m/z. Die Substanzen haben unter der Annahme, daß im positiven Mode erneut das Natrium-Addukt detektiert wird, demnach eine Molekülmasse von 368 g/mol; 14 Masseneinheiten über der Masse der Caffeoyl-Chinasäuren. Die Differenz deutet auf eine zusätzliche Methylgruppe im Molekül hin. Da die Chlorogensäuren selbst nicht im Methanol-Eluat der Polyamidsäulen-Chromatographie eluieren (siehe 2.2.1),

scheidet Feruloyl-Chinasäure hier als mögliche Verbindung aus. Da MS/MS-Spektren und die UV-Chromatogramme deutlich die Anwesenheit von Kaffeesäure im Molekül belegen, muß die vermutete Methylgruppe an die Chinasäure gebunden vorliegen und es sich um Methylester der Chlorogensäuren handeln.

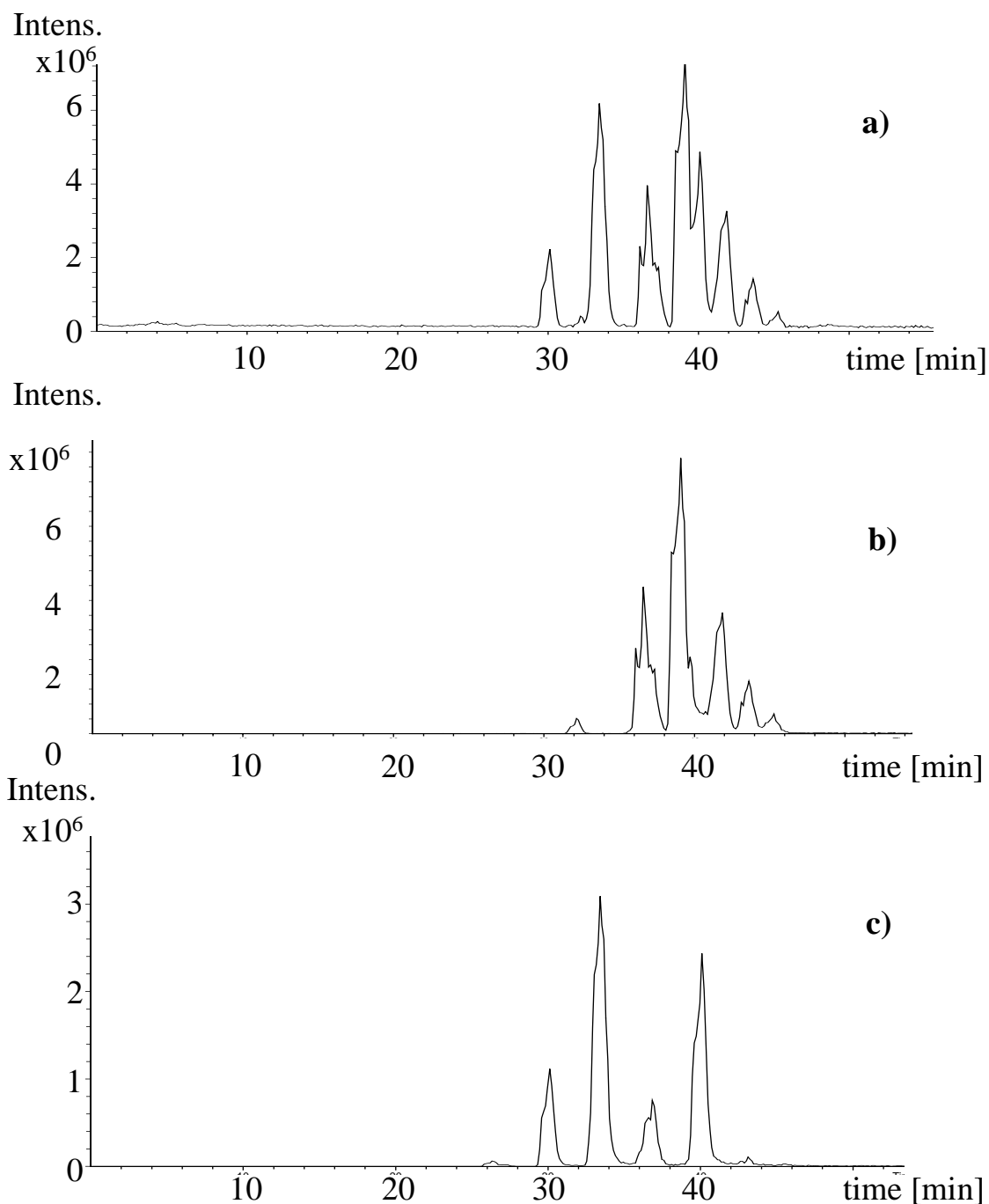


Abb. 63 Totalionenstrom (positiver ESI-Mode) der Fraktion VI der Sephadex G10
 Fraktionierung (a) und die Ionenspuren der Massen 359 m/z (b) und 391 m/z (c)

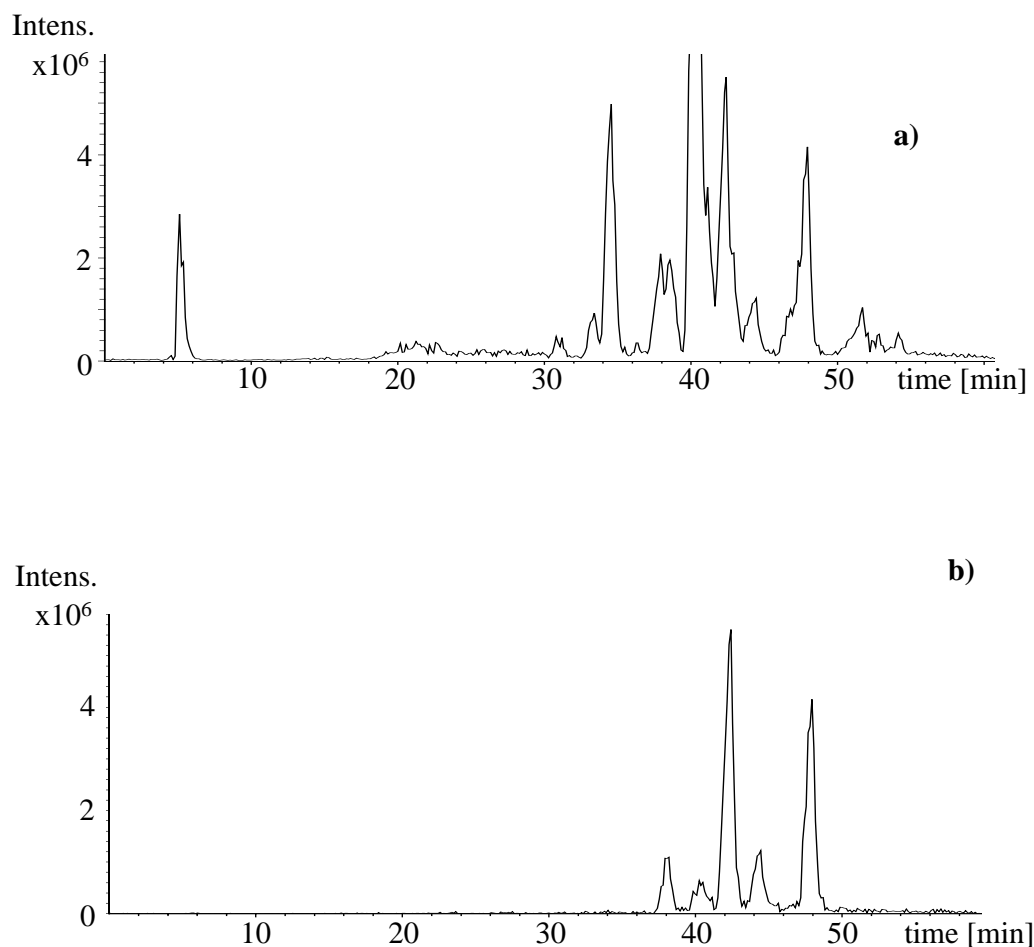


Abb. 64 Totalionenstrom der Fraktion VI der Sephadex G10 Fraktionierung (a) und die Ionenspuren der Massen 405 m/z (b)

Diese Vermutung wird bestätigt durch die Signale mit der Masse 405 m/z in Fraktion VI der Gelchromatographie (siehe Abb. 64). Die UV-Spektren und die Abspaltung von 177 m/z im MS/MS-Spektrum belegen die Anwesenheit von Ferulasäure im Molekül. Die Masse ist erneut um 14 Masseneinheiten höher als die der Feruloyl-Chinasäure: Ein Indiz für eine zusätzliche Methylgruppe im Molekül.

2.2.5.2 Synthese von Chlorogensäure-Methylestern

Die Methylester der Caffeoyl- und Feruloyl-Chinasäure werden synthetisiert (siehe Material und Methoden). Die Synthese basiert auf der Umsetzung der Chlorogensäure in salzsaurem Methanol (Nishizawa et al., 1988). Ausgehend von z.B. 5-Caffeoyl-Chinasäure wird durch

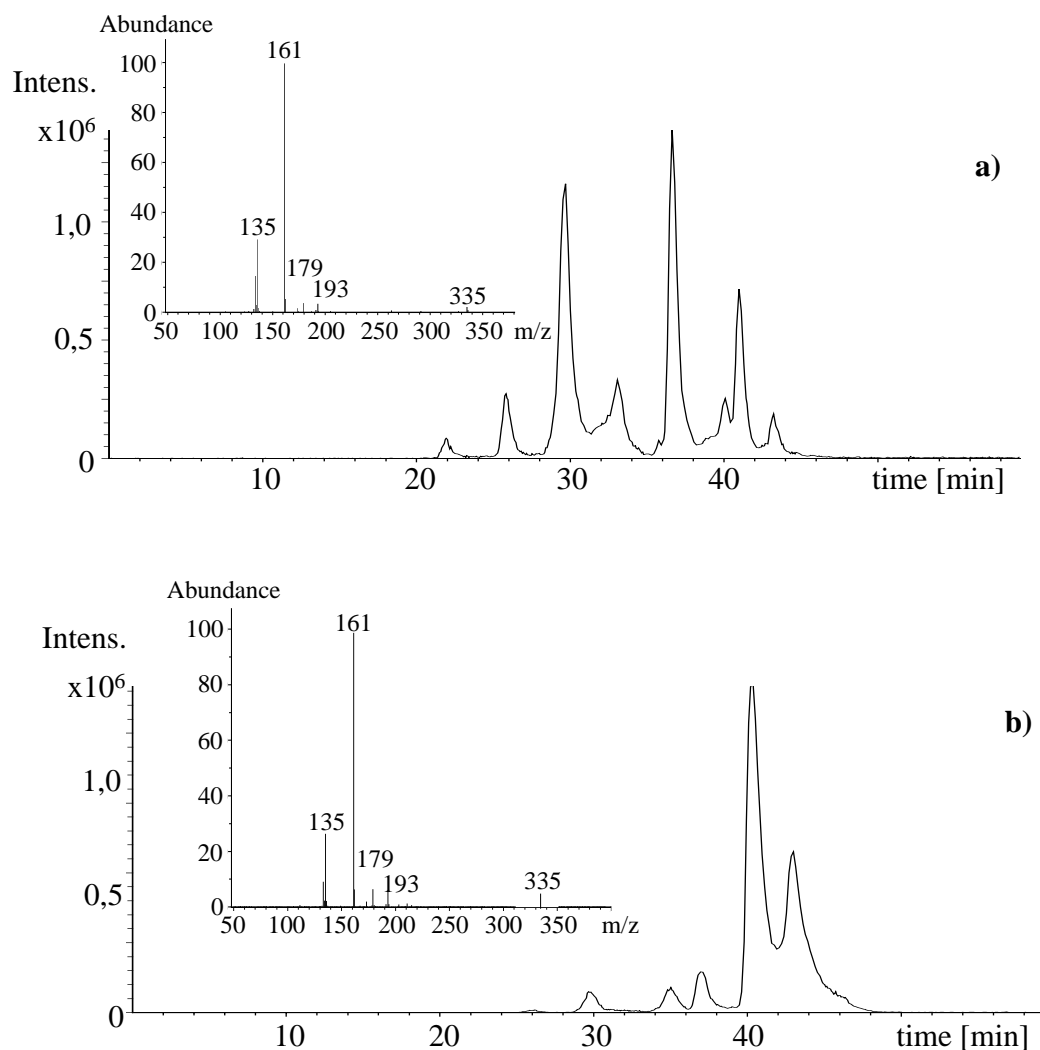


Abb. 65 Ionenspur 391 m/z der Fraktion VI (a) und des Caffeoyl-Chinasäuremethylester-Isomeren-Gemisches (b); MS/MS-Spektren der 391 m/z bei 40,5 min.

Zugabe des salzsauren Methanols ausschließlich der 5-Caffeoyl-Chinasäuremethylester gebildet. Um eine Verseifung bei Zugabe von Wasser zum Reaktionsansatz zu vermeiden, wird neutralisiert. Hier tritt leicht eine Isomerisierung des gebildeten Esters auf, sodaß ein Methylestergemisch entsteht, welches chromatographisch in die einzelnen Isomeren getrennt werden muß. Beim LC-ESI-MS Vergleich des nach Neutralisation erhaltenen Isomeren-Gemisches mit der Fraktion VI zeigt sich eine Übereinstimmung in Retentionszeit und MS/MS-Spektren (siehe Abb. 65). Die Zuordnung der Substanzen der Masse 368 g/mol und 383 g/mol im Methanol-Eluat zu Caffeoyl-Chinasäuremethylester und Feruloyl-Chinasäuremethylester kann somit abgesichert werden.

2.2.5.3 Überprüfung auf Artefakt-Bildung

Wie aus dem Aufarbeitungsschema nach 2.1.3.1 ersichtlich, wird mit Methanol als organischem Lösungsmittel gearbeitet. Eine Methylierung von freien Carboxylgruppen, wie denen der Chlorogensäuren während der Aufarbeitung, ist daher nicht auszuschließen. Daher wird die gleiche Aufarbeitung mit 5-Caffeoyl-Chinasäure durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen via LC-ESI-MS auf die Anwesenheit von 5-Caffeoyl-Chinasäuremethylestern untersucht. In keiner Fraktionen können Methylester nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, daß die Chlorogensäuren während der durchgeführten Aufarbeitung nicht methyliert werden.

Alternativ wird die Röstkaffee-Aufarbeitung mit Ethanol wiederholt. Die LC-ESI-MS Analyse der Sephadex-Fractionen der gelchromatographischen Trennung des Ethanol-Eluats der Polyamidsäule zeigt die Anwesenheit der Chlorogensäuremethylester. Demzufolge handelt es sich bei den Verbindungen nicht um Aufbereitungsartefakte.

2.2.5.4 Isolierung und Strukturaufklärung

Zur abschließenden Identifizierung werden die Methylester aus der Kaffeematrix isoliert. Die Röstkaffee-Fraktionierung wird hierfür auf den semipräparativen Maßstab ausgedehnt und die verwendete Sephadex G10 Säule von 1,5 x 60 cm auf 2,5 x 80 cm vergrößert. Das Gel wird mit Methanol zum Quellen gebracht und konditioniert. Es eluieren zwei stark absorbierende, braun gefärbte Banden. Bei der LC-ESI-MS Analyse finden sich die Ionenspuren der Chlorogensäuremethylester in Fraktion III. Die analytischen HPLC-Bedingungen werden auf den semipräparativen Maßstab übertragen, um eine Isolierung der Substanzen in für die Strukturaufklärung ausreichender Menge zu erreichen. Mit dem Methanol/Essigsäure-Gradienten (siehe Material und Methoden) kann die analytische Trennung ansatzweise erzielt werden und drei Substanzen im Milligramm-Bereich isoliert werden. Die Analyse mittels Massenspektrometrie im negativen ESI-Mode zeigt die Chlorogensäuremethylestermassen (368 m/z bzw. 383 m/z) für die isolierten Verbindungen.

In der NMR-spektroskopischen Analyse zeigen sich die charakteristischen Signale einer phenolischen Säure zwischen 6,6 bis 7,6 ppm mit trans-ständigen Doppelbindungsprotonen und ein Singulett bei 3,70 ppm, das für 3 Protonen integriert. Verschiebung und Signalstruktur sprechen hier für eine Methylester-Gruppe. Ferner finden sich Signale für die Protonen der Chinasäure am C3 bis C5-Atom bei 4,15, 4,9 und 5,35 ppm. Die Signalstruktur

ist allerdings nicht ausreichend aufgespalten, um eine Isomerenzuordnung zu treffen. Beim Vergleich mit den Literaturdaten des 5-Caffeoyl-Chinasäuremethylesters decken sich Verschiebung der Protonen und soweit vergleichbar das Aufspaltungsmuster. Auch hier tritt bei 3,68 ppm ein Singulett für die Methylester-Gruppe auf (Nishizawa et al., 1988). Im ^1H -NMR der Substanz der Masse 384 g/mol zeigen sich ebenso die Signale einer phenolischen Säure zwischen 6,6 bis 7,6 ppm und zwei für drei Protonen integrierende Signale bei 3,90 ppm und 3,70 ppm, die für eine Methoxy-Gruppe an der phenolischen Säure und eine Methyl-Estergruppe sprechen. Leider sind auch hier die Signale für eine abschließende Isomerenzuordnung nicht ausreichend.

3 Zusammenfassung

Diketopiperazine in Röstkaffee

- Prolin-haltige Diketopiperazine entstehen bei der Röstung aus Kaffee-Proteinen und wurden hier erstmals identifiziert. Die Röstung der isolierten wasserlöslichen Rohkaffee-Proteine führte zur Bildung der folgenden fünf Diketopiperazine: cyclo(pro-ile), cyclo(pro-leu), cyclo(pro-phe), cyclo(pro-pro) und cyclo(pro-val). Die Substanzen traten in beiden möglichen Isomeren-Formen, als cis- und als trans-Isomer auf. Die Identifizierung wurde über Vergleich mit synthetisierten Referenz-Substanzen mittels LC-ESI-MS und GC-EI-MS Analyse abgesichert. Die DKP-Referenz-Substanzen wurden sowohl chemisch synthetisiert, als auch über Röstung der sie aufbauenden Aminosäuren und chromatographische Isolierung aus der Röstmischung gewonnen.
- Röstkaffee wurde über ein mehrstufiges Aufarbeitungsschema fraktioniert. Nach weitergehender Aufkonzentrierung des Wasser-Eluats der Polyamidsäule konnten folgende prolin- und phenylalanin-haltige Diketopiperazine erstmals in Röstkaffee identifiziert werden: cyclo(phe-ile), cyclo(phe-leu), cyclo(phe-val), cyclo(pro-ala), cyclo(pro-gly), cyclo(pro-ile), cyclo(pro-leu), cyclo(pro-phe), cyclo(pro-pro) und cyclo(pro-val). Bis auf cyclo(pro-pro), bei dem eine Trennung der beiden möglichen Isomeren nicht erreicht werden konnte, wurden alle Diketopiperazine in ihrer cis- und trans-Konfiguration identifiziert. Dabei traten cyclo(pro-ile), cyclo(pro-leu), cyclo(pro-phe), cyclo(pro-pro) und cyclo(pro-val) als Haupt-Diketopiperazine hervor.
- Die sensorische Analyse der Einzelverbindungen in Wasser bestätigte ihren Bittergeschmack mit Erkennungsschwellen zwischen 20-40 ppm. Die Substanzen verhielten sich im Bezug auf ihre Bitterkeit additiv, ein Synergismus mit Coffein konnte weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden.
- Es wurde eine Methode zur Quantifizierung der fünf prolin-haltigen Haupt-Diketopiperazine cyclo(pro-ile), cyclo(pro-leu), cyclo(pro-phe), cyclo(pro-pro) und cyclo(pro-val) erarbeitet und die Gehalte in Handelskaffee, entcoffeiernem Kaffee, Espresso und über eine Kaffee-Röstserie quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mittels LC-ESI-MS über die Ionenspuren der Substanzen. Es wurden Gehalte in der Summe zwischen 5-7 mg/50g Röstkaffee in Handelskaffees nachgewiesen. Alle untersuchten Kaffees zeigten dabei ähnliche Gehalte. Somit hat die Komposition der Kaffees aus verschiedenen Kaffee-Provenienzen keinen Einfluß auf die DKP-Gehalte. In Espressos

fanden sich Gehalte zwischen 19-23 mg/50g, in entcoffeiiniertem Kaffee mit ca. 3 mg/50g niedrigere Gehalte. Die Gehalte der DKPs in Handelskaffees lagen demnach unter der Bitterkeits-Erkennungsschwelle. In Espressos lagen die Werte exakt im Schwellenbereich und es kann von einer Beteiligung der Substanzen an der wahrnehmbaren Bitterkeit des Espressos ausgegangen werden.

- Die Analyse der Kaffee-Röstserie zeigte eine signifikante Zunahme der Diketopiperazin-Gehalte mit zunehmendem Röstgrad. In grünem und niedrig geröstetem Kaffee konnten keine Diketopiperazine nachgewiesen werden, über mittel bis dunkel geröstetem Kaffee stiegen die Gehalte dann stark an. Im hohen Röstbereich war keine Sättigung festzustellen, sodaß auf eine hohe thermische Stabilität der prolin-haltigen Diketopiperazine geschlossen werden kann.
- Die Analyse der cis- und trans-Isomeren der Diketopiperazine zeigte eine Verschiebung der Verhältnisse zugunsten des trans-Isomers mit zunehmendem Röstgrad. Während bei niedrigem Röstgrad ausschließlich das cis-Isomer gebildet wurde, kam es mit zunehmendem Röstgrad zu einer verstärkten Bildung des trans-Isomers, dessen Gehalte die des cis-Isomers bei hohem Röstgrad überstiegen. Ausgehend von den Prekursoren, den Rohkaffee-Proteinen, die ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut sind und so nur cis-DKPs bilden können, kommt es demnach erst im Verlauf der Röstung zur Umlagerung der cis-Isomere zu den thermisch stabileren trans-Isomeren.

Chlorogensäure-Derivate in Röstkaffee

- Chlorogensäurelactone konnten als Hauptkomponenten des bitteren Methanol-Eluats der Röstkaffee-Fraktionierung identifiziert werden. Neben den bereits bekannten 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid können 5-Caffeoyl- δ -Chinid, 5-Caffeoyl- γ -Chinid, 3-Feruloyl- γ -Chinid und 4-Feruloyl- γ -Chinid durch Vergleich mit Referenz-Substanzen erstmals in Röstkaffee identifiziert werden.
- Die Lactone entstehen während der Röstung als Haupt-Abbauprodukte der Chlorogensäuren. In Modellröstung von 5-Caffeoyl-Chinasäure konnten vier isomere Lactone identifiziert werden. Es handelt sich um 5-Caffeoyl- δ -Chinid, 5-Caffeoyl- γ -Chinid, 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Röstkaffee eine abweichende Isomerenverteilung mit 5-Caffeoyl- δ -Chinid und 5-Caffeoyl- γ -Chinid als Haupt-Isomere. Es wird ein Bildungsmechanismus der Lactonentstehung aus 5-CQA erarbeitet.

- Die sensorische Analyse des Heisswasserextrakts der 5-CQA-Modellröstung zeigte eine Bitterkeits-Erkennungsschwelle von 43 ppm, die isolierte Lacton-Fraktion eine Bitterkeits-Erkennungsschwelle von 19 ppm. Die Gehalte an 3-Caffeoyl- γ -Chinid und 4-Caffeoyl- γ -Chinid in Handelskaffee werden in der Literatur mit in der Summe 120 ppm angegeben. Die Lactone sind demnach in sechsfach über der Bitterkeits-Erkennungsschwelle liegenden Gehalten im Handelskaffee enthalten und tragen zur Bitterkeit des Röstkaffees bei.
- Als weitere Bestandteile des Methanol-Eluats wurden Chlorogensäuremethylester vorläufig identifiziert. Eine Strukturaufklärung der einzelnen Chlorogensäuremethylester-Isomere erfolgte nicht. Die Substanzen konnten im Rohkaffee nicht nachgewiesen werden, daher ist von Ihrer Bildung während der Röstung auszugehen.

4 Material und Methoden

4.1 Kaffee und Chemikalien

4.1.1 Verwendeter Kaffee

Isolierung der Rohkaffee-Proteine und Herstellung der Röstserie: Brazil, Arabica

Isolierung der Feruloyl-Chinasäure und anderer Chlorogensäuren: Robusta, Ivory Coast

Quantifizierung der Diketopiperazine: vier Röstkaffees, ein entcoffeinierter Kaffee und zwei Espressos aus dem Handel.

4.1.2 Chemikalien

Aceton	reinst	Riedel-de Haën, Seelze
Aceton-d ₆	99,8 %	Deutero, Kastellaun
Acrylamid	research grade	Boehringer, Ingelheim
Ammoniumpersulfat	> 98 %	Sigma, St.Louis (USA)
Ammoniumsulfat	99,5 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
Anionenaustauscher Dowex 50 X8		Fluka, Buchs (Schweiz)
Bromphenolblau		Fluka, Buchs (Schweiz)
1-Butanol	99,5 %	Acros, New Jersey (USA)
Chloroform	HPLC-grade	Acros, New Jersey (USA)
cis-cyclo(Pro-Leu)	> 98 %	Bachem, Heidelberg
Coomassie BrilliantBlau G 250	99 %	Sigma, Steinheim
Essigsäure	99 – 100 %	Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol, absolut	HPLC-grade	Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol	techn.	
Ethylacetat	techn.	
Faltenfilter	595½, Ø 270 mm	Schleicher & Schuell
Glycin	99,5 %	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat Pentahydrat	> 99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
L-Alanin	99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)

L-Glycin	99,7 %	Merck, Darmstadt
L-Isoleucin	99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
L-Leucin	99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
L-Phenylalanin	99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
L-Prolin	> 99 %	Merck, Darmstadt
L-Valin	99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
Methanol	techn.	
Methanol	HPLC-grade	Acros, New Jersey (USA)
Methanol-d4	99,8 %	Deutero, Kastellaun
Membranfilter PTFE PP 0,45 µm		Lida, Kenosha / WI
Natriumchlorid	99,5 %	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	99,5 %	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat, wasserfrei	99-100 %	Riedel-de Haën, Seelze
NN'-Methylenbis-Acrylamid	research grade	Boehringer, Ingelheim
Phosphorsäure	85 %	Riedel-de Haën, Seelze
Polyamid SC 6 (0,05-0,156 mm)		Machery-Nagel, Düren
Rinderserumalbumin	98 %	Sigma, Steinheim
Salzsäure	37 %	Riedel-de Haën, Seelze
Seesand	reinst	Merck, Darmstadt
Sephadex G10		Aldrich, Millwaukee
TEMED	99 %	Sigma, Steinheim
(N,N,N',N'-Tetramethylethylen-Diamin)		
Tris	Ultra pure	ICN Biomedicals,
(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)		Ohio (USA)

Wenn nicht anders angegeben, wird doppelt entmineralisiertes Wasser (Barnstead, NANOpure) verwendet.

4.2 Semipräparative Arbeiten

4.2.1 Geräte und Methoden

4.2.1.1 Röster

Es wird ein nach dem Wirbel-Schicht-Prinzip arbeitender Laborröster verwendet. Justiert wird die Geschwindigkeit der Zuluft-Röstluft sowie die Hitze der Röstluft. Für die Röstserie wird die Röstzeit mit 3 min konstant gehalten. Variiert wird die Rösttemperatur von 150°C bis 330°C. Röstvolumen: 100 g

4.2.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Geräte

1. Beckman System

Pumpen:	Beckman System Gold Solvent Module 116 (Beckman Instruments)
Mischer:	Beckman System Gold System Organizer
Probenaufgabe:	Rheodyne-Einspritzventil
Detektor:	Beckman System Gold Programmable Detector Module 166 (Beckman Instruments)
Steuereinheit:	NEC PC-8201 A
Datenverarbeitung:	Chromatographiedatensystem Andromeda (Techlab GmbH)

2. Hewlett Packard System 1100

Pumpe:	Binary Pump G1312 A
Säulenofen:	ColCom 1316A
Probenaufgabe:	Autosampler G1329A ALS + Thermostatisierungseinheit 1330A
Detektor:	DAD G1315A
Datenverarbeitung:	ChemStation Version A.06.03

3. LC-MS-System

Pumpe:	Hewlett Packard System 1100 Binary Pump G1312A
Probenaufgabe:	Rheodyne-Einspritzventil 20 µL
Detektor:	Lichrograph L-4000/4200 (Merck / Hitachi, Tokyo, Japan)
Datenverarbeitung:	ChemStation Version A.06.01
Integrator:	Chromatopac C-R 6A (Shimadzu)
MS:	Bruker Esquire (siehe Massenspektren 4.2.1.5)

Verwendete Säulen

Analytische Säulen

1. Nucleosil 100-5 C18 HD ET (Länge: 25 cm, ID: 4 mm) (Macherey-Nagel)
+ Vorsäule Nucleosil ET 100-5 C18 HD (Länge: 11 cm, ID: 4 mm)
2. Phenyl-Hexyl Luna 5µ (Länge: 25 cm, ID: 4,6 mm) (Phenomenex)
+ Vorsäule Phenyl-Propyl Luna 5µ (Länge: 3 cm, ID: 4 mm) (Phenomenex)

Semipräparative Säulen

3. Nucleosil 100-7 C18 SP (Länge: 25 cm, ID: 21 mm) (Macherey-Nagel)
+ Vorsäule Nucleosil 100-7 C18 SP (Länge: 5 cm, ID: 10 mm) (Macherey-Nagel)

Verwendete Gradienten

1. Methanol/Essigsäure (2 %)-Gradient

Zeit	Methanol [%]	Essigsäure [%]
0	5	95
5	5	95
50	50	50
60	50	50
70	90	10
80	5	95

Fluß 0,5 mL/min
Säule Nr.1

Gradient für die LC-ESI-MS Kopplung. Analyse folgender Fraktionen:

- Analyse der Gelchromatographie-Fraktionen
- Fraktionen der allgemeinen Röstkaffee-Aufarbeitung
- Screening-Gradient für alle weiteren Fraktionen
- Quantifizierung der prolin-haltigen Diketopiperazine

2. Ethanol/Wasser-Gradient

Zeit	Ethanol [%]	Wasser [%]
0	5	95
5	5	95
50	50	50
60	50	50
70	90	90
80	5	95

Fluß 0,5 mL/min
Säule Nr.1

Gradient zum Screening der gerösteten Rohkaffee-Proteine & LC-ESI-MS der Gelchromatographie-Fraktionen der gerösteten Rohkaffee-Proteine

3. Isolierung der Caffeoyl-Chinasäurelactone aus der Lactonfraktion

Isokratisch 25 % Methanol / 75 % Wasser
Fluß 1,0 mL/min
Säule Nr.2

4. Isolierung der Feruloyl-Chinasäurelactone aus der Lactonfraktion

Isokratisch 35 % Methanol / 75 % Wasser

Fluß 1,0 mL/min

Säule Nr.2

5. Semipräparative HPLC: Methanol/Wasser-Gradient

Zeit	Methanol [%]	Essigsäure [%]
0	30	70
5	30	70
60	80	20
65	30	70

Fluß 5,0 mL/min

Säule Nr.3

Gradient zur Trennung des Rohkaffee-Extrakts & der Caffeoyl-Chinasäure-Röstung (Heißwasser-Extrakt)

6. Semipräparative HPLC: Methanol/Wasser-Gradient

Zeit	Methanol [%]	Essigsäure [%]
0	30	70
5	30	70
45	60	40
60	80	20
70	30	70

Fluß 5,0 mL/min

Säule Nr.3

Gradient zur Trennung der Feruloyl-Chinasäure-Röstung

4.2.1.3 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Pumpe	Biotronik HPLC Pump BT 3020; Fluß: 2,9 mL/min
Gerät	HSCCC PTR Model ccc-1000 (Pharma Tech Research) Umdrehungszahl: 800 U/min; Injektor: Rheodyne 5041 4-Wege-Ventil, Probenschleife 20 mL.
Detektor	Knauer Variable Wavelength Monitor, Wellenlänge: 220 nm
FraktionssammLer	Pharmacia LKB-Super Frac.
Trennsystem	Ethylacetat / Wasser 50:50 (v/v)

Die angegebenen Bedingungen werden für die Isolierung der Diketopiperazine eingesetzt.

4.2.1.4 Gaschromatographie (GC)

Geräte

1. Carlo Erba Series 3000

Gerät	Carlo Erba HRGC 5160 Mega
Injektor	Split / splitlose Injektion
Carrier-Gas	Helium 1,1 mL/min
Temperatur-Programm	180°C für 30 min, dann 10°C/min auf 300°C
Detektor	FID bzw. Finnigan MAT ITDS (siehe Massenspektrometer)

2. Hewlett Packard

Gerät	Hewlett Packard GC 5890 Serie II
Injektor	Splitlose Injektion
Carrier-Gas:	Helium 1,1 mL/min
Temperatur-Programm	200°C für 25 min, dann in 10 min auf 300°C
Detektor	MSD 5972 Hewlett Packard (siehe Massenspektrometer)

Verwendete Säulen

1. DB-5 MS (60 m x 0,25 mm i.d. 0,25 µm)
2. DB-5 (60 m x 0,25 mm i.d. 0,25 µm)

Die angegebenen Temperaturprogramme gelten für die Analyse aller Sephadex-Fractionen sowie für die Quantifizierung der Diketopiperazine.

4.2.1.5 Massenspektren (MS)

GC-EI-MS

Zur Aufnahme von EI-Massenspektren wird ein Single Stage Quadrupol (SSQ 710) (EI-Interface) von Finnigan mit direkter Kopplung zur Gaschromatographie verwendet. Transferline 300°C; Ionisierungsenergie 70 eV bei 150 °C. Als Massenbereich wurde 38-425 u gewählt.

Alternativ wird ein Hewlett Packard Ion Trap MSD 5972 verwendet. Direkte Kopplung zum EI-Interface; 70 eV Ionisierungsenergie bei 180 °C; Massenbereich 40-400 u.

ESI-MSⁿ

Zur Aufnahme von ESI-MSⁿ-Spektren wird ein Bruker Esquire (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet. Der Probeneinlaß erfolgt über eine Spritzenpumpe bei 240 µL/min. Die Interface- und Massenspektrometer-Einstellungen wird für jede zu bestimmende Substanz optimiert.

Konstante Interface Einstellungen. Dry Temp.: 300°C, Dry Gas 4,0 L/min, Nebulizer Gas Stickstoff: 10 psi.

ESI-MS/MS

Verwendet wird ein Bruker Esquire (Bruker Daltonik GmbH, Bremen). Der Probeneinlaß erfolgt über Kopplung mit einer HPLC über das ESI-Interface (Bruker Daltonik GmbH, Bremen). Konstante Interface Einstellungen. Dry Temp.: 300°C, Dry Gas 10,0 L/min, Nebulizer Gas Stickstoff: 50 psi. Für das Screening werden die MS und MS/MS-Parameter (Skimmer, Trap Drive, usw.) den zu analysierenden Fraktionen angepaßt.

ESI-MS Einstellungen zur Diketopiperazin-Quantifizierung:

Capillary	3000 V
End Plate Offset	500 V
Skimmer I	30 V
Skimmer II	10 V
Cap Exit Offset	60 V
Trap Drive	30
Scan Range	50-500 m/z
Accu time	200 ms

4.2.1.6 Kernresonanzspektren (NMR)

Die Aufnahme der ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren erfolgt an einem Bruker AMX 300. Als deuterierte Lösungsmittel werden Aceton, Dimethylsulfoxid, Methanol und Wasser eingesetzt. Kalibriert wird auf das Restsignal der Lösungsmittelprotonen.

4.2.1.7 Säulenchromatographie (SC)

4.2.1.7.1 Gelpermeationschromatographie

Verwendet wird das Dextrangel Sephadex G10 (Pharmacia Biotech, Schweden). Das Gel wird im Lösungsmittel zum Quellen gebracht und folgend in die Säule gefüllt.

Säulendimension	60 mm x 1,5 mm Glassäule (Pharmacia Biotech, Schweden)
Detektion	visuell, bzw. mit Durchfluß-Photometer UV-Chromatochord (Serva Technik, Heidelberg) Detektionswellenlänge: 254 nm
Autosampler	Advantec SF-2120 Super Fraction Collector

1. Gelpermeationschromatographie der gereinigten Acetonfällung nach 2.1.1

50 mg der gereinigten Acetonfällung werden in 2 mL Wasser gelöst und auf die mit Wasser konditionierte Sephadex G10 Säule gegeben. Es wird mit Wasser eluiert und das Eluat in Fraktionen à 5 mL aufgefangen. Die protein-haltigen Fraktionen weisen einen sichtbaren

Graustich auf, somit erfolgt die Detektion visuell. Die protein-haltigen Fraktionen werden vereinigt, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -18°C gelagert.

2. *Gelpermeationschromatographie der gerösteten Acetonfällung nach 2.1.2*

50 mg des gefriergetrockneten Heißwasser-Extraktes der gerösteten Acetonfällung wird in 2 mL Wasser gelöst und auf die mit Wasser konditionierte Sephadex G10 Säule gegeben. Eluiert wird mit Wasser. Die Detektion erfolgt visuell, gut lassen sich zwei hintereinander von der Säule eluierende braune Banden erkennen. Die Fraktionen werden zu je 25 mL gesammelt, gefriergetrocknet und zur weiteren Analyse bei -18°C gelagert.

3. *Gelpermeationschromatographie des mit Chloroform extrahierten Wasser-Eluats der Polyamidsäule nach 2.1.3*

50 mg des Wassereeluats der Polyamidsäule der allgemeinen Röstkaffee-Fraktionierung werden in Wasser gelöst und über die Sephadex G10 Säule fraktioniert. Die Aufarbeitung entspricht weiterhin der der gerösteten Acetonfällung (siehe 1.).

4. *Gelpermeationschromatographie des Methanol-Eluats der Polyamidsäule nach 2.2.1*

50 mg des gefriergetrockneten Methanol-Eluats der Polyamidsäule der allgemeinen Röstkaffee-Fraktionierung werden in 2 mL Methanol gelöst und mittels der mit Methanol konditionierten Sephadex G10 Säule getrennt. Die Elution wird bei 254 nm beobachtet. Es lassen sich zwei starke absorbierende Banden erkennen, die ferner eine leicht braunen Färbung aufweisen. Die Fraktionen werden zu je 25 mL vereinigt, gefriergetrocknet und bei -18°C gelagert.

5. *Semipräparative Gelpermeationschromatographie des Methanol-Eluats der Polyamidsäule nach 2.2.5*

Säulendimension	80 mm x 2,5 mm (Pharmacia Biotech, Schweden)
Detektion	Durchfluß-Photometer UV-Chromatochord (Serva Technik, Heidelberg) Detektionswellenlänge: 254 nm
Autosampler	Advantec SF-2120 Super Fraction Collector

Das Gel wird in Methanol zum Quellen gebracht und in die Säule gefüllt. 100 mg des gefriergetrockneten Methanol-Eluats der Polyamidsäule werden in Methanol gelöst und auf

die Säule gegeben. Eluiert wird ebenfalls mit Methanol. Die Fraktionen à 25 mL werden gesammelt und gefriergetrocknet.

4.2.1.7.2 Polyamidsäulenchromatographie

Im Rahmen der allgemeinen Röstkaffee-Fraktionierung nach 2.1.3

Die Trennung an Polyamid erfolgt entsprechend Kiehne (1996). Eine 15 x 2 cm i.D. Glassäule (Merck, Darmstadt) wird mit Glaswolle, Seesand und vorgequollenem Polyamid beschickt; Füllhöhe 10 cm. Die Säule wird mit 250 mL Wasser konditioniert. Es werden 200 mg des Methanol-Extrakts der allgemeinen Röstkaffee-Fraktionierung in wenigen Millilitern Wasser gelöst und auf die Säule gegeben. Es wird folgendermaßen eluiert:

1. Wasser (250 mL)
2. Methanol (250 mL)
3. 10%iger Ammoniak (250 mL)

Die Fraktionen werden getrennt aufgefangen, gefriergetrocknet und bei -18°C gelagert.

4.2.1.8 Gelelektrophorese

4.2.1.8.1 Trennung der Proteine der wasserlöslichen Rohkaffee-Protein Isolierung

Verwendet wird eine Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 16 % Acrylamid bei konstantem Strom von 50 mA nach Janson und Rydén (1998).

Gerät	Bio-Rad Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad)
Power Supply	Bio-Rad Power Pac 3000

Lösungen

- Acrylamid 49 g Acrylamid und 1 g NN'-Methylenbis-Acrylamid in einem 100 mL-Meßkolben mit Wasser auffüllen. (Haltbarkeit der Lösung bei RT 4-8 Wochen, im Kühlschrank doppelt so lange).

- Trenngelpuffer 9,08 g Tris/HCl pH 8,8, 0,2 g SDS in 50mL-Meßkolben mit Wasser auffüllen
- Sammelgelpuffer 3,03 g Tris/HCl pH 6,8, 0,2 g SDS in 50mL-Meßkolben mit Wasser auffüllen
- Elektrodenpuffer 6,055 g Tris, 28,150 g Glycin, 2,0 g SDS in 500mL-Meßkolben mit (4-fach) Wasser auffüllen
- Probenpuffer 2,5 mL Sammelgelpuffer, 1,0 mL Glycerin, 0,5 mL 2-Mercaptoethanol (nur wenn reduzierend gearbeitet werden soll, also auch die Disulfid-Brücken der Proteine gespalten werden sollen), 0,3 g SDS, eine Spatelspitze Bromphenolblau auf 10 mL mit Wasser auffüllen.
- APS 0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 mL Wasser (jeden Tag neu ansetzen)

Gelzusammensetzung

Trenngel (16 % Acrylamid) 4,32 mL Acrylamid-Stammlösung, 3,38 mL Trenngelpuffer, 5,80 mL Wasser, 10 µl TEMED, 20 µl APS

Sammelgel (5 % Acrylamid) 1 mL Acrylamid-Stammlösung, 2,5 mL Sammelgelpuffer, 6,5 mL Wasser, 20 µl TEMED, 40 µl APS

Die verwendeten Gele (Größe 9 cm x 6 cm x 0,1 cm) setzen sich aus einem Trenngel (16 % Acrylamid) und einem Sammelgel (5 % Acrylamid) zusammen. Zur Herstellung der Gele wird zunächst zwischen Gießstand und alkoholgereinigten Glasplatten mit Agarose abgedichtet. In den Spalt zwischen den beiden gleich großen Platten wird etwa zu $\frac{3}{4}$ der Gesamthöhe Trenngel gegossen und sofort mit Butanol (ca 0,5 cm) überschichtet. Die Polymerisation des Gels kann dann als abgeschlossen betrachtet werden, wenn sich zwischen der Butanol- und der Gelphase eine dritte Phase (Wasser) gebildet hat (ca. 60 min). Das Butanol ist mit Nanopure rückstandlos vom Gel zu abzuspielen und der Kammerraum über dem polymerisierten Trenngel mit Filterpapier zu trocknen. Man setzt den Probenkammer-Kamm ein und gießt das Sammelgel luftblasenfrei ein.

Die fertigen Gele werden in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingehängt und der Kamm vorsichtig nach oben herausgezogen. Anschließend werden die Probestaschen gefüllt und die Trennung bei 50 mA durchgeführt.

Probelösungen

Die Konzentration der Probelösungen für die einzelnen Probestaschen liegt bei maximal 6 mg/mL. 20 µL Probelösung werden mit 30 µL Probenpuffer versetzt, vermischt und mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen eingebracht.

4.2.1.8.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Lösungen

Fixierlösung	250 mL Methanol, 50 mL Essigsäure, 200 mL Wasser
Spüllösung I	40 g Ammoniumsulfat, 9,2 mL Phosphorsäure, 451 mL Wasser
Färbelösung	0,4 g Coomassie Brilliant Blue, 40 g Ammoniumsulfat, 100 mL Methanol, 350 mL Nanopure, 9,2 mL Phosphorsäure
Spüllösung II	125 mL Methanol, 375 mL Nanopure
Aufbewahrung	125 Ammoniumsulfat, 500 mL Nanopure

Färbezeiten

Fixierbad	60 Minuten
Spüllösung I	15-20 Sekunden
Färbelösung	über Nacht
Spüllösung II	ca. eine Minute
Ammoniumsulfatlösung	Aufbewahrung

4.3 Aufarbeitungen und Probenvorbereitungen

4.3.1 Isolierung von Rohkaffee-Proteinen

Mahlen des Rohkaffees

Als Rohkaffee wird ein Arabica Brazil verwendet. Der Rohkaffee wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf eine Korngröße $< 0,5$ mm gemahlen. Die verwendete Mühle ist eine Rotor-Schnellmühle von Fritsch (Pulverisette). Bis zur weiteren Verarbeitung werden die gemahlenen Bohnen bei -18°C gelagert.

Kaltwasserextrakt

10 g gemahlener Rohkaffee werden in einen 300 mL-Jodzahlkolben eingewogen, mit 100 mL Wasser versetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Es wird zentrifugiert (13500 rpm, 20 min) und der Überstand über einen Büchner-Trichter mittels Wasserstrahlpumpe durch einen Selectron-Filter (Schleicher-Schuell Typ GF92 50 mm) filtriert. Das Filtrat wird gefriergetrocknet und bei -18°C aufbewahrt.

Acetonfällung

3 g Kaltwasserextrakt werden in einen 300 mL-Jodzahlkolben eingewogen, mit 100 mL Wasser versetzt und 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend werden 100 mL Aceton zügig hinzugegossen. Es wird zentrifugiert (13500 rpm, 20 min), der Rückstand in Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und bei -18°C aufbewahrt.

Reinigung der Acetonfällung

50 mg Acetonfällung werden exakt in einen 300 mL-Jodzahlkolben eingewogen und mit 100 mL Wasser versetzt. Es wird zentrifugiert (13500 rpm, 20 min) und membranfiltriert (Cellulose Acetat Membranfilter $0,45\ \mu\text{m}$, Lida Manufacturing Corp.). Es wird gefriergetrocknet und der Extrakt bei -18°C aufbewahrt.

4.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Gerät

Die Messungen werden an einem Spektralphotometer der Firma Shimadzu UV-2101 PC UV-Vis Scanning Spektrophotometer durchgeführt.

Proteinbestimmung nach Bradford (Darbre, 1986)

Für die Färbelösung werden 25 mg Coomassie BrilliantBlau G 250 in einem 500 mL-Kolben in 25 mL Ethanol gelöst, mit 50 mL Phosphorsäure versetzt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Für die benötigte Salzlösung werden 4,383 g Natriumchlorid in 500 mL Wasser gelöst. Es wird eine Sechs-Punkt-Kalibrierung mit Rinderserumalbumin durchgeführt. 10 mg Rinderserumalbumin werden in 50 mL Wasser eingewogen. Von dieser Lösung werden jeweils 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL und 5 mL abgenommen und auf 10 mL mit Wasser aufgefüllt. Die Proben sind so einzuwiegen, daß die Proteingehalte der resultierenden Meßlösungen etwa 200 µg/mL betragen.

Die Meßlösungen setzen sich wie folgt zusammen: 1 mL der zu vermessenden Lösung wird mit 1 mL Natriumchloridlösung und 5 mL Färbelösung versetzt. Diese Lösung ist innerhalb einer Stunde bei 595 nm in Kunststoffküvetten zu vermessen. Die Vergleichslösung besteht aus 1 mL Wasser, 1 mL Natriumchlorid-Lösung und 5 mL Färbelösung.

Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode (Darbre, 1986)

Lösung A: 40 g Natriumhydroxid werden in einen 100 mL-Kolben eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. 0,25 mg Kupfersulfat werden in 25 mL Wasser gelöst. 21 mL der Kupfersulfatlösung werden zusammen mit 75 mL der Natronlauge in einen 100 mL- Kolben gegeben und mit Wasser aufgefüllt.

Lösung B: 30 g Natriumhydroxid werden in einen 100 mL-Kolben eingewogen und mit Wasser aufgefüllt.

Für die Kalibrierung werden 25 mg BSA exakt in einen 50 mL-Kolben eingewogen und je 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL und 8 mL auf 10 mL mit Wasser verdünnt. Für die Proben soll die Proteinkonzentration bei etwa 400 µg/mL liegen, hierfür sind ca. 20 mg Probe in 50 mL Wasser einzuwiegen. 2 mL der zu vermessenden Lösung werden mit 1 mL der Lösung A versetzt. Diese Lösung wird für mindestens fünf Minuten bei 310 nm in Kunststoffküvetten vermessen. Die Vergleichslösung ist aus 2 mL Wasser und 1 mL Lösung A zusammenzustellen. In einer zweiten Messung ist dann Lösung A gegen Lösung B zu ersetzen.

4.3.3 Modellröstung

Alle Modellröstungen werden in einer selbstkonstruierten Modellröstapparatur durchgeführt. In einen 100 mL-Zweihalskolben werden 10 g Seesand und 100-200 mg der zu röstenden

Substanz eingewogen. Die Probe wird homogen mit dem Seesand vermischt. Die Röstung erfolgt bei 290°C für die gewünschte Zeit. Dabei wird der Ofen auf 290°C vorgeheizt, der Kolben in das System integriert und 10 sec mit Stickstoff geflutet. Das System wird verschlossen und, sobald der Ofen wieder 290°C erreicht, hat die Zeit genommen. Nach Verstreichen der gewünschten Röstzeit wird der Kolben aus dem System entfernt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Kolbenrückstand wird mit 30 mL des Lösungsmittels extrahiert und filtriert. Sowohl Kolben wie auch Filter werden mit Lösungsmittel nachgespült. Der Extrakt wird gefriergetrocknet und bei -18°C gelagert.

4.3.4 Allgemeine Röstkaffee-Fraktionierung

Extraktion mit Wasser

20 g gemahlener Kaffee werden in einen Kaffeefilter eingewogen und mit 500 mL siedendem Wasser übergossen. Der Extrakt wird nach dem Abkühlen gefriergetrocknet.

Extraktion mit Methanol

1 g des gefriergetrockneten Wasserextraktes wird in einen 100 mL-Jodzahlkolben eingewogen, mit 50 mL Methanol versetzt und 2 h bei RT gerührt. Es wird filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt (100 mbar, 25°C), mit Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

4.3.5 Fraktionierung zum Nachweis von Diketopiperazinen in Röstkaffee

Extraktion mit Chloroform

1 g des gefriergetrockneten Wasser-Eluats der Polyamidsäule wird in 25 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit je 50 mL Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phasen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei reduziertem Druck eingeengt, der Rest mit Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

4.3.6 Alternative Röstkaffee-Fraktionierung

Heißwasserextrakt

Entspricht Extraktion mit Wasser (4.3.4)

Ethanol-Extrakt

2 g des gefriergetrockneten Heißwasserextrakts werden in einen 300 mL-Jodzahlkolben eingewogen und mit 100 mL Ethanol (HPLCgrade) versetzt. Es wird für 2 h bei RT unter Rühren extrahiert. Anschließend wird filtriert und der Extrakt am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt, mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Extraktion mit Chloroform

200 mg des gefriergetrockneten Ethanolextraktes werden in 50 mL Wasser gelöst und dreimal mit je 50 mL Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phasen werden vereinigt und gefriergetrocknet, die extrahierte wäßrige Phase wird zur Extraktion mit Ethylacetat eingesetzt.

Ethylacetatextrakt

Die mit Chloroform extrahierte wäßrige Phase wird dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Zur beschleunigten Phasentrennung wird nach jeder Extraktion zentrifugiert (3000 U, 3 min). Die Ethylacetatphasen werden vereinigt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand gefriergetrocknet.

4.4 Quantitative Bestimmungen

4.4.1 Quantifizierung von Diketopiperazinen in Röstkaffee

4.4.1.1 Probenaufarbeitung

Heißwasserextrakt

Entspricht der Extraktion mit Wasser unter 4.3.4 Einwaage 20 g.

Chloroform-Extrakt

Nach Abkühlen auf RT wird der Heißwasserextrakt viermal mit je 50 mL Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phasen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei reduziertem Druck eingengt. Nach Einengen um etwa die Hälfte werden 200 mL 0,001 M HCl-Lösung zugegeben und das Chloroform rückstandslos am Rotationsverdampfer entfernt.

Anionen-Austauschchromatographie

Es wird eine 1,5 x 20 cm Säule mit Dowex 50 X8 Anionenaustauscher-Harz verwendet. Die Säule wird mit 500 mL 0,1 M HCl und 500 mL 0,001 M HCl konditioniert. Anschließend wird der in 0,001 M HCl aufgenommene Chloroform-Extrakt aufgegeben (siehe 4.3.6) und die Säule abschließend mit 500 mL 0,001 M HCl gewaschen. Das Eluat wird viermal mit 50 mL Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer fast zur Trockne eingengt und in einem 25 mL-Meßkolben überführt. Der Kolben wird mit Methanol nachgespült und bis zur Marke gefüllt.

4.4.1.2 Kalibrierung und Reproduzierbarkeit

Die Diketopiperazine werden über eine Kalibrierfunktion aus den chemisch synthetisierten cis-Diketopiperazinen quantifiziert. Ausgewertet wird über die Peakflächen.

4.4.1.3 Methodenparameter

Wiederfindung: 20 g eines Handelskaffees werden einmal mit und einmal ohne Zusatz an den fünf Diketopiperazinen entsprechend dem Aufarbeitungsschema aufgearbeitet und analysiert. Die zugegebene Diketopiperazin-Menge entspricht dem analytisch ermittelten Gehalt in dem Handelskaffee. Die Wiederfindung wird mehrmals durchgeführt.

Standard-Abweichung und Variationskoeffizient: Für die Ermittlung der Standardabweichung und der Variationskoeffizienten wird ein Handelskaffee zehnmal aufgearbeitet und analysiert. Die Berechnung erfolgt nach Doerffel (1984).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i' - x_i'')^2}{2N}}$$

s Standardabweichung [g/kg i.Tr.]
 x_i' x_i'' Einzelwerte der Doppelbestimmung

$$VK = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

VK Variationskoeffizient [%]
 S Standardabweichung
 —

4.5 Synthesen

4.5.1 Chemische Synthese von cis-Diketopiperazinen

4.5.1.1 Synthese der Benzyloxycarbonyl-[Z]-aminosäuren

N-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-prolin (*Z*-(*S*)-Prolin)

In einen 50 mL-Rundkolben werden 1,8002 g (15,6 mmol) (*S*)-Prolin in 7,7 mL 2 N NaOH unter Rühren gelöst. Nachdem die Lösung mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt wurde, gibt man innerhalb von 5 Minuten 2,8 mL Chlorameisensäurebenzylester (3,388 g; 19,9 mmol) und 7,9 mL 2 N NaOH hinzu. Man läßt weitere 5 Minuten bei 0 °C rühren und versetzt die Lösung danach wiederum bei 0 °C mit 8,1 mL 2 M HCl, wobei die Bildung eines weißen Feststoffes beobachtet werden kann. Die trübe Lösung wird dann mit ca. 100 mL Ethylacetat (EtOAc) ausgeschüttelt, wobei der weiße Niederschlag in die organische Phase übergeht. Die EtOAc-Phase wird anschließend nacheinander einmal mit 50 mL verdünnter HCl, einmal mit 50 mL H₂O und dreimal mit je 50 mL 7%iger NaHCO₃-Lsg. ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden mit 37%iger HCl auf einen pH-Wert von mindestens 2 gebracht und danach dreimal mit je 70 mL EtOAc ausgeschüttelt. Man trocknet über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel unter reduziertem Druck. Zurück bleibt ein hochviskoses und leicht gelbes Öl, das ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 3,77 g (96,8 %)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,83-2,37 (2m, 4H, 2×CH₂), 3,41-3,70 (m, 2H, CH₂), 4,34-4,48 (m, 1H, CH), 5,08-5,25 (m, 2H, OCH₂Ph), 7,18-7,41 (m, 5H, arom.-H), 8,86 (s, breit, 1H, COOH)

Analog werden folgende Benzyloxycarbonyl-[Z]-aminosäuren synthetisiert:

Substanz	Ausbeute [%]
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-phenylalanin (<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Phenylalanin)	90,1
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 2,97-3,25 (m, 2H, CH ₂ Ph), 4,67-4,80 (m, 1H, CH), 5,01-5,18 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 5,23 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, NH), 7,14-7,36 (m, 10H, arom.-H), 8,14 (s, breit, 1H, COOH)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-leucin (<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Leucin)	84,9
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 0,95 (d, <i>J</i> = 5,7 Hz, 6H, 2×CH ₃), 1,51-1,83 (m, 3H, CH(CH ₃) ₂ , CHCH ₂), 4,34-4,50 (m, 1H, NHCH), 5,06-5,20 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 5,20 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, NH), 7,21-7,39 (m, 5H, arom.-H), 8,66 (s, breit, 1H, COOH)	

4.5.1.2 Synthese der Aminosäuremethylesterhydrochloride

Glycinmethylester-HCl

75 mL MeOH werden in einem 250 mL-Rundkolben mittels einer Eis/NaCl-Kältemischung auf –10 °C gekühlt und nacheinander unter Rühren langsam mit 25 mL SOCl₂ (0,34 mol), 1 mL *N*-*N*-Dimethylformamid und 12,76 g (0,17 mol) Glycin versetzt. Man erwärmt die Lösung auf Raumtemperatur und lässt sie weiterhin rühren, wobei sich das restliche nicht gelöste Glycin langsam löst. Nach 2½ Stunden fällt der entstandene Glycinmethylester-HCl als weißer Niederschlag aus der Reaktionslösung aus. Man lässt die Lösung zur Vervollständigung der Veresterung über Nacht ohne weiteres Rühren bei Raumtemperatur stehen. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit wenig kaltem MeOH zur Entfernung der Verunreinigungen gewaschen, wobei ein leicht gelber Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 19,45 g (75,0 %)

¹H-NMR (D₂O): δ = 3,94 (s, 3H, OCH₃), 4,04 (s, 2H, CH₂)

(S)-Alaninmethylester-HCl

Es werden 30 mL MeOH in einem 100 mL-Rundkolben auf –10 °C gekühlt und nacheinander unter Rühren langsam mit 8 mL (0,11 mol) SOCl₂, 0,5 mL *N*-*N*-Dimethylformamid und portionsweise mit 2,4342 g (27,3 mmol) (*S*)-Alanin versetzt, wobei sich das (*S*)-Alanin

vollständig auflöst. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 26 Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und zurück bleibt ein leicht rotes und viskoses Öl, welches nach ca. 1 Woche unter Kühlung ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) auskristalliert. Das erhaltene Rohprodukt wird aus EtOAc/Hexan umkristalliert, indem der Rückstand in wenig EtOAc unter leichtem Erwärmen gelöst und danach so lange mit Hexan versetzt wird, bis eine leichte Kristallbildung eintritt. Zur Vervollständigung der Kristallisation wird die Lösung für 2 Tage bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Kühlschrank). Die kristalline Substanz wird von der Mutterlauge durch Filtrieren abgetrennt und mit wenig Hexan nachgewaschen, wobei ein leicht öliges Feststoff erhalten wird. Ausbeute: 3,41 g (89,5 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,70$ (d, $J = 7,3\text{ Hz}$, 3H, CHCH_3), $3,80$ (s, 3H, OCH_3), $4,19\text{--}4,35$ (m, 1H, CHCH_3), $8,66$ (s, breit, 3H, $\text{NH}_2\text{-HCl}$)

Analog werden folgende Aminosäuremethylesterhydrochloride synthetisiert:

Substanz	Ausbeute [%]
<i>(S)</i> -Valinmethylester-HCl	74,9
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,13$ (d, $J = 7,1\text{ Hz}$, 3H, CH_3), $1,14$ (d, $J = 7,1\text{ Hz}$, 3H, CH_3), $2,38\text{--}2,54$ (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $3,81$ (s, 3H, OCH_3), $3,91\text{--}4,00$ (m, 1H, NH_2CH), $8,83$ (s, breit, 3H, $\text{NH}_2\text{-HCl}$)	
<i>(S)</i> -Leucinmethylester-HCl	91,1
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0,97$ (d, $J = 5,9\text{ Hz}$, 6H, $2\times\text{CH}_3$), $1,78\text{--}2,03$ (2m, 3H, CH_2 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $3,79$ (s, 3H, OCH_3), $4,10$ (t, $J = 6,9\text{ Hz}$, 1H, NH_2CH), $8,81$ (s, breit, 3H, $\text{NH}_2\text{-HCl}$)	
<i>(S)</i> -Phenylalaninmethylester-HCl	99,2
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 3,16\text{--}3,35$ (m, 2H, CH_2Ph), $3,80$ (s, 3H, OCH_3), $4,33$ (t, $J = 6,8\text{ Hz}$, 1H, CH), $7,26\text{--}7,40$ (m, 5H, arom.-H)	
<i>(S)</i> -Prolinmethylester-HCl	99,8
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) $\delta = 2,03\text{--}2,22$ (m, 3H, CH_2), $2,35\text{--}2,51$ (m, 1H, CH_2), $3,34\text{--}3,48$ (m, 2H, CH_2), $3,86$ (s, 3H, OCH_3), $4,36\text{--}4,45$ (m, 2H, CH)	

4.5.1.3 Synthese der Z-geschützten Dipeptidmethylester

N-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-prolyl-glycinmethylester [*Z*-(*S*)-Pro-GlyOMe]

Zu einer Lösung aus 0,8218 g (3,30 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-prolin in 15 mL absolutem Tetrahydrofuran (THF) werden bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eis/NaCl-Kältebad) unter Rühren 0,56 g (0,49 mL; 5,20 mmol) Chlorameisensäureethylester hinzugefügt. Man läßt für weitere 15 Minuten bei dieser Temperatur rühren. Danach erfolgt bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nacheinander die Zugabe von 0,4143 g (3,30 mmol) des Glycinmethylesters-HCl, welcher zuvor in 7,6 mL *N*-*N*-Dimethylformamid suspendiert wurde, und von 0,60 g (0,66 mL; 5,45 mmol) *N*-Methylmorpholin, wobei ein weißer Feststoff ausfällt. Das Reaktionsgemisch wird für 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und weitere 16 Stunden (über Nacht) bei Raumtemperatur ohne weiteres Rühren stengelassen. Danach wird die Lösung filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wird in 200 mL EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wird dann nacheinander zweimal mit je 20 mL 10%iger Citronensäurelösung, zweimal mit je 30 mL 7%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 20 mL dest. H_2O gewaschen. Man trocknet über Na_2SO_4 und entfernt das Lösungsmittel unter reduziertem Druck. Das Produkt wird als gelbes Öl erhalten, welches ohne weitere Aufarbeitung zur weiteren Synthese eingesetzt wird. Ausbeute: 0,5507 g (52,2 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,77\text{--}2,39$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), $3,38\text{--}3,63$ (m, 2H, CH_2), 3,72 (s, 3H, OCH_3), $3,90\text{--}4,13$ (m, 2H, CH_2), $4,28\text{--}4,48$ (m, 1H, CH), $5,05\text{--}5,24$ (m, 2H, OCH_2Ph), $7,21\text{--}7,45$ (m, 5H, arom.-H)

Analog werden folgende *Z*-geschützten Dipeptidmethylester synthetisiert:

Substanz	Ausbeute [%]
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-prolyl-(<i>S</i>)-alaninmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Pro-(<i>S</i>)-AlaOMe]	50,1
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,39$ (d, $J = 7,1\text{ Hz}$, 3H, CH_3), $1,74\text{--}2,37$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), $3,35\text{--}3,62$ (m, 2H, CH_2), 3,74 (s, 3H, OCH_3), $4,25\text{--}4,42$ (m, 1H, CH), $4,42\text{--}4,58$ (m, 1H, CH), $5,06\text{--}5,25$ (m, 2H, OCH_2Ph), $7,24\text{--}7,40$ (m, 5H, arom.-H)	

Substanz	Ausbeute [%]
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-prolyl-(<i>S</i>)-valinmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Pro-(<i>S</i>)-ValOMe]	67,2
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 0,86 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 0,96 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, CH ₃), 1,74-2,43 (m, 5H, 2×CH ₂ , CH(CH ₃) ₂), 3,34-3,72 (m, 2H, CH ₂), 3,73 (s, 3H, OCH ₃), 4,20-4,51 (m, 2H, 2×CH), 5,00-5,22 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 7,10-7,40 (m, 5H, arom.-H)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-prolyl-(<i>S</i>)-phenylalaninmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Pro-(<i>S</i>)-PheOMe]	27,9
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 1,70-2,37 (m, 4H, CH ₂), 2,90-3,25 (m, 2H, CH ₂), 3,40-3,71 (m, 2H, CH ₂), 3,71 (s, 3H OCH ₃), 4,04-4,23 (m, 1H, CH), 4,23-4,50 (m, 1H, CH), 5,08-5,22 (m, 2H OCH ₂ Ph), 6,95-7,44 (m, 5H, arom.-H)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-prolyl-(<i>S</i>)-prolinmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Pro-(<i>S</i>)-ProOMe]	34,5
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 1,78 (m, 8H, CH ₂), 3,34-3,72 (m, 4H, CH ₂), 3,71 (s, 3H, OCH ₃), 4,21-4,52 (m, 2H, 2×CH), 5,00-5,23 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 7,22-7,38 (m, 5H, arom.-H)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-phenylalanyl-(<i>S</i>)-alaninmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Phe-(<i>S</i>)-AlaOMe]	29,9
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 1,32 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H, CH ₃), 2,96-3,16 (m, 2H, CH ₂ Ph), 3,70 (s, 3H, OCH ₃), 4,38-4,57 (m, 2H, 2×CH), 5,00-5,11 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 5,37 (d, <i>J</i> = 5,8 Hz, 1H, NH), 6,40 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H, NH), 7,07-7,38 (m, 10H, arom.-H)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-phenylalanyl-(<i>S</i>)-valinmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Phe-(<i>S</i>)-ValOMe]	40,4
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 0,81 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 0,84 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H, CH ₃), 1,99-2,11 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 3,01-3,15 (m, 2H, CH ₂ Ph), 3,69 (s, 3H, OCH ₃), 4,37-4,51 (m, 2H, 2×CH), 4,99-5,13 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 5,35 (s, 1H, NH), 6,30 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, NH), 7,16-7,39 (m, 10H, arom.-H)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-phenylalanyl-(<i>S</i>)-phenylalaninmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Phe-(<i>S</i>)-PheOMe]	32,8
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 2,90-3,14 (m, 4H, 2×CH ₂ Ph), 3,67 (s, 3H, OCH ₃), 4,30-4,47 (m, 1H), 4,72-4,84 (m, 1H, CH), 4,97-5,14 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 5,25 (s, breit, 1H, NH), 6,25 (d, breit, <i>J</i> = 7,4 Hz, 1H, NH), 6,90-7,40 (m, 15H, arom.-H)	

Substanz	Ausbeute [%]
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-leucyl-(<i>S</i>)-phenylalaninmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-PheOMe]	38,5
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 0,90 (d, <i>J</i> = 6,3 Hz, 6H, 2×CH ₃), 1,36-1,53 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 1,53-1,74 (m, 2H, CH ₂), 3,00-3,15 (m, 2H, CH ₂ Ph), 3,71 (s, 3H, OCH ₃), 4,05-4,22 (m, 1H, CH), 4,79-4,89 (m, 1H, CH), 5,04-5,18 (m, 3H, NH, OCH ₂ Ph), 6,47 (d, <i>J</i> = 6,7 Hz, 1H, NH), 7,00-7,40 (m, 10H, arom.-H)	
<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-(<i>S</i>)-leucyl-(<i>S</i>)-prolinmethylester [<i>Z</i> -(<i>S</i>)-Leu-(<i>S</i>)-ProOMe]	34,9
¹ H-NMR (CDCl ₃): δ = 0,83-1,01 (m, 6H, 2×CH ₂), 1,45-2,30 (4m, 7H, CH(CH ₃) ₂ , 3×CH ₂), 3,37- 3,66 (m, 2H, CH ₂), 3,71 (s, 3H, OCH ₃), 4,21-4,43 (m, 2H, 2×CH), 5,00-5,25 (m, 2H, OCH ₂ Ph), 7,25-7,38 (m, 5H, arom.-H)	

4.5.1.4 Synthese der Dipeptidmethylester durch Hydrogenolyse

(*S*)-Propyl-glycinmethylester [*H*-(*S*)-Pro-GlyOMe]

Eine Suspension aus 0,1097 g (0,34 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-(*S*)-prolyl-glycinmethylester, welcher in 15 mL MeOH gelöst wurde, und 30 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) werden in einer Apparatur zur Durchführung von Hydrierungen ½ Stunde bei 30 °C mit H₂ bei einem Druck von 5 bar begast. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator abfiltriert und mit reichlich MeOH nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Man erhält einen weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung zur weiteren Synthese eingesetzt wird. Ausbeute: 0,0587 g (92,1 %)

¹H-NMR (CD₃OD): δ = 1,74-2,08 (m, 3H, CH₂), 2,20-2,40 (1H, CH₂), 3,14-3,65 (m, 2H, CH₂), 3,77 (s, OCH₃)*, 3,87-4,15 (m, 2H, CH₂), 4,15-4,27 (m, 1H, CH)

* Anhand der Integralhöhe (entspricht nicht mehr 3H) für das Singulett der Methoxygruppe wird deutlich, daß das vorliegende Produkt z. T. bereits das Cyclisierungsprodukt enthält.

Analog werden folgende Z-geschützten Dipeptidmethylester synthetisiert:

Substanz	Ausbeute [%]
<i>(S)</i> -Propyl- <i>(S)</i> -alaninmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Pro- <i>(S)</i> -AlaOMe]	80,4
¹ H-NMR (CD ₃ OD): δ = 1,38 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 1,75-2,10 (m, 3H CH ₂), 2,24-2,38 (m, 1H, CH ₂), 3,45-3,60 (m, 2H, CH ₂), 3,71 (s, 3H, OCH ₃), 4,04-4,30 (m, 2H, 2×CH)	
<i>(S)</i> -Propyl- <i>(S)</i> -valinmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Pro- <i>(S)</i> -ValOMe]	97,8
¹ H-NMR (CD ₃ OD): δ = 0,93 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 0,95 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 1,70-2,25 (m, 5H, 2×CH ₂ , CH(CH ₃) ₂), 2,95-3,10 (m, 2H, CH ₂), 3,72 (s, 3H, OCH ₃), 4,02-4,13 (m, 1H, CH), 4,29-4,41 (m, 1H, CH)	
<i>(S)</i> -Propyl- <i>(S)</i> -phenylalaninmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Pro- <i>(S)</i> -PheOMe]	99,8
¹ H-NMR (CD ₃ OD): δ = 1,54-2,19 (m, 4H, 2×CH ₂), 2,84-3,42 (m, 4H, CH ₂ CH ₂ Ph), 3,71 (s, 3H, OCH ₃), 3,88-4,11 (m, 1H, CH), 4,66-4,82 (m, 1H, CH), 7,12-7,34 (m, 5H, arom.-H)	
<i>(S)</i> -Propyl- <i>(S)</i> -prolinmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Pro- <i>(S)</i> -ProOMe]	93,1
¹ H-NMR (CD ₃ OD): δ = 1,85-2,05 (m, 6H, CH ₂), 2,20-2,38 (m, 2H, CH ₂), 3,18-3,61 (m, 4H, 2×CH ₂), 3,72 (s, 3H, OCH ₃), 3,90-4,02 (m, 1H, CH), 4,22-4,40 (m, 1H, CH)	
<i>(S)</i> -Phenylalanyl- <i>(S)</i> -alaninmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Phe- <i>(S)</i> -AlaOMe]	93,5
¹ H-NMR (CD ₃ OD): δ = 1,35 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H, CH ₃), 2,80 (dd, <i>J</i> = 7,7 Hz, 7,6 Hz, 1H, CH ₂ Ph), 3,06 (dd, <i>J</i> = 5,7 Hz, 5,5 Hz, 1H, PhCH ₂), 3,28-3,33 (m, 1H, CH), 3,58-3,64 (m, 1H, CH), 3,70 (s, 3H, OCH ₃), 7,13-7,35 (m, 5H, arom.-H)	
<i>(S)</i> -Phenylalanyl- <i>(S)</i> -valinmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Phe- <i>(S)</i> -ValOMe]	93,0
¹ H-NMR (CD ₃ OD): δ = 0,91 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 0,92 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 2,00-2,16 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 2,81 (dd, <i>J</i> = 7,6 Hz, 7,5 Hz, 1H, CH ₂ Ph), 3,04 (dd, <i>J</i> = 5,7 Hz, 5,7 Hz, 1H, CH ₂ Ph), 4,30 (d, <i>J</i> = 6,0, 1H, CH), 4,40-4,70 (m, 1H, CH), 7,14-7,34 (m, 5H, arom.-H)	
<i>(S)</i> -Phenylalanyl- <i>(S)</i> -phenylalaninmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Phe- <i>(S)</i> -PheOMe]	97,0
¹ H-NMR (CD ₃ OD/C ₅ D ₅ N) δ = 2,21 (dd, <i>J</i> = 7,1 Hz, 7,2 Hz, 2H, CH ₂ Ph), 2,85 (dd, <i>J</i> = 4,1 Hz, 4,0 Hz, 2H, CH ₂ Ph), 4,11 (d, <i>J</i> = 4,0, 1H, CH), 4,14 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1H, CH), 7,05-7,30 (m, 10H, arom.-H)	

Substanz	Ausbeute [%]
<i>(S)</i> -Leucyl- <i>(S)</i> -phenylalaninmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Leu- <i>(S)</i> -PheOMe]	98,6
¹ H-NMR (D ₂ O/C ₅ D ₅ N): δ = 0,16 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H, CH ₃), 0,33 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H, CH ₃), 0,38-0,69 (m, 2H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂), 0,91-1,12 (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 2,69 (dd, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4,8 Hz, 1H, CH ₂ Ph), 2,96 (dd, <i>J</i> = 3,5 Hz, 3,5 Hz 1H, CH ₂ Ph), 3,21-3,36 (m, 1H, CH) 4,00-4,08 (m, 1H, CH), 6,60-6,90 (m, 5H, arom.-H)	
<i>(S)</i> -Leucyl- <i>(S)</i> -prolinmethylester [<i>H</i> - <i>(S)</i> -Leu- <i>(S)</i> -ProOMe]	91,7
¹ H-NMR (D ₂ O): δ = 0,98-1,15 (m, 6H, 2×CH ₃), 1,65-2,53 (3m, 7H, 3×CH ₂ , CH(CH ₃) ₂), 3,52-3,70 (m, 2H, CH ₂), 3,88 (s, 3H, OCH ₃), 4,08-4,41 (m, 2H, 2×CH ₂)	

4.5.1.5 Synthese der Diketopiperazine

(6S)-Hexahydropyrrolo-[1,2-*a*]-pyrazin-1,4-dion [*cyclo*(Pro-Gly)]

Es werden 0,0447 g (0,24 mmol) *H*-(*S*)-Pro-GlyOMe in 20 mL *n*-Butanol/Toluol (3:1) gelöst und 13 ½ Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel entfernt und zurück bleibt ein gelber Feststoff. Diese Kristalle werden mit wenig EtOAc gewaschen, so daß man als gereinigtes Produkt einen weißen Feststoff erhält.

Ausbeute: 0,0251 g (67,8 %)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,70-2,20 (m, 3H, CH₂), 2,20-2,47 (m, 1H, CH₂), 3,40-3,75 (m, 2H, CH₂), 3,85 (dd, 1H, CH), 4,00-4,18 (m, 2H, CH₂), 6,97 (s, breit, 1H, NH)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 3,755; 9,806; 26,656; 27,995 (4×CH₂), 39,897 (CH), 144,893; 151,315 (2×CO)

Analog werden folgende Diketopiperazine synthetisiert: *cis*-*cyclo*(Pro-Ala), *cis*-*cyclo*(Pro-Val), *cis*-*cyclo*(Pro-Leu), *cis*-*cyclo*(Pro-Phe), *cis*-*cyclo*(Phe-Ala), *cis*-*cyclo*(Phe-Val), *cis*-*cyclo*(Phe-Leu), *cis*-*cyclo*(Phe-Phe).

Spektroskopische Daten der synthetisierten Diketopiperazine siehe Anhang XIII.

4.5.2 Modellröstung von Aminosäuren

Für die Synthese von prolin-haltigen Diketopiperazinen werden L-Prolin und die entsprechende L-Aminosäure im Verhältnis 1:2 mit der zehnfachen Menge Seesand vermengt und bei 290°C für vier Minuten geröstet. Es wird mehrfach mit Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand gefriergetrocknet und die Diketopiperazine über semi-präparative RP-HPLC (siehe 4.2.1.2) oder HSCCC (siehe 4.2.1.3) isoliert.

Folgende Diketopiperazine werden isoliert: cis- und trans-cyclo(Pro-Val), cis- und trans-cyclo(Pro-Leu), cis- und trans-cyclo(Pro-Ile), cis- und trans-cyclo(Pro-Phe), cis- und trans-cyclo(Phe-Val), cis- und trans-cyclo(Phe-Leu), cis- und trans-cyclo(Phe-Ile).

Die spektroskopischen Daten sind im Anhang XIII zusammengesetzt.

4.5.3 Synthese von Chlorogensäuremethylestern

Die Synthese erfolgt analog der Vorschrift von Nishizawa et al. (1988). 100 mg Chlorogensäure werden in 10 mL salzsaurem Methanol (5%ig) gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, filtriert und gefriergetrocknet.

Der gefriergetrocknete Extrakt besteht aus dem Isomerengemisch der gebildeten Methylester und wird über semipräparative RP-HPLC getrennt.

4.6 Sensorische Untersuchungen

Die sensorischen Prüfungen werden im institutseigenen Sensorikraum durchgeführt, der den Vorschriften des § 35 LMBG zur Lebensmittelsensorik entspricht (§35 LMBG, 1983). Das Ansetzen der Proben erfolgt in Glas-Meßkolben und die Verkostung aller Proben in Glas-Bechergläsern. Als Löffel zur Verkostung werden Haushalts-Kaffeelöffel aus Kunststoff verwendet, sowie Kunststoff-Einwegpipetten zur Dosierung. Alle Proben werden kurz vor Beginn der Sensorik angesetzt.

4.6.1 Erkennung der Grundgeschmacksarten

Die Durchführung richtet sich nach § 35 LMBG (1997). Folgende Lösungen werden angesetzt: Coffein (0,3 g/L), Natriumchlorid (1,3 g/L), Citronensäure (0,4 g/L) und Saccharose (6,0 g/L). Die Lösungen werden zufällig auf 10 Bechergläser verteilt, die mit den Zahlen 1-10 beschriftet sind. Ferner wird als Probe auch Wasser eingefügt. Die Probenmenge pro Becherglas beträgt 40 mL. Ferner wird ein Becherglas mit Wasser, das als solches gekennzeichnet ist, zum Vergleich und zum Spülen bereitgestellt. Eine Rückverkostung innerhalb der Reihe wird nicht gestattet. Den Probanden ist vorgegeben, den Lösungen die Attribute „Bitter“, „Salzig“, „Sauer“ und „Süß“ bzw. „Wasser“ zuzuordnen.

4.6.2 Bestimmung der Schwellenwerte

Die Durchführung richtet sich nach § 35 LMBG (1997). Ausgehend von einer Coffein-Stammlösung (2,5 g/L) werden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45 und 50 mL dieser Lösung mit Wasser auf 500 mL verdünnt. Die Proben werden in aufsteigender Konzentration in zehn Bechergläser, die mit den Zahlen 1-10 beschriftet sind, gefüllt. Ein mit „0“ gekennzeichnetes Becherglas enthält Wasser. Es wird mit der Wasser-Probe begonnen und in aufsteigender Konzentration verkostet. Ein Vergleich mit Wasser oder eine Rückverkostung ist nicht gestattet. Die Probanden sollen die Lösung als „Reizschwelle“ kennzeichnen, die anders schmeckt als die vorherige, und die Lösung, bei der sie den Geschmack „Bitter“ einwandfrei identifizieren als „Erkennungsschwelle“.

4.6.3 Triangeltest

Die Durchführung richtet sich nach § 35 LMBG (1996). Es wird eine Coffein-Stammlösung (1,0 g/100 mL) hergestellt und davon 10 bzw. 15 mL auf 500 mL verdünnt. Diese Lösungen werden durch Losen zufällig auf drei Bechergläser verteilt, die mit den Zahlen „22, 24, 26“ bzw. „41, 43, 45“ gekennzeichnet sind. Die abweichende Probe kann dabei stärker oder schwächer konzentriert sein, bzw. alle gleich konzentriert. Zusätzlich wird ein Becherglas mit Wasser, das als solches gekennzeichnet ist, bereitgestellt. Ein Spülen mit Wasser und Rückverkosten in einer Triangel ist erlaubt. Die Probanden sollen die abweichende Probe feststellen bzw. haben auch die Möglichkeit mit „kein Unterschied“ zu antworten.

4.6.4 Rangordnungsprüfung

Die Durchführung richtet sich nach § 35 LMBG (1983). Ausgehend von einer Coffein-Stammlösung (2,5 g/L) werden 10, 20, 30, 40 und 50 mL dieser Lösung mit Wasser auf 500 mL verdünnt. Die Lösungen werden zufällig auf fünf Bechergläser verteilt, die mit den Buchstaben A-E gekennzeichnet sind. Als weitere Probe kann Wasser eingeführt werden. Ein Spülen mit Wasser und Rückverkosten ist erlaubt. Die Probanden sollen die Lösungen nach aufsteigender Konzentration sortieren.

4.6.5 Bestimmung der Bitterkeits-Erkennungsschwelle aller Fraktionen, bzw. isolierten Substanzen

Die Verkostung der Röstkaffee-Fraktionen, der Diketopiperazine, sowie der Chlorogensäure-Lactone zur Bestimmung deren Bitterkeits-Erkennungsschwellenwertes erfolgt analog 4.6.2. Allerdings wird hier zur Minimierung der Probenmenge die Verdünnung in 50 mL-Meßkolben durchgeführt und auch die Ausgangslösung mit verkostet. Es werden sechs Verdünnungen angesetzt. Das sei am folgenden Beispiel für cis-cyclo(Pro-Leu) verdeutlicht. Für die Stammlösung werden ca. 5 mg cis-cyclo(Pro-Leu) exakt in einen 50 mL-Meßkolben eingewogen und folgende Verdünnungen durchgeführt:

1. 25 mL Stammlösung auf 50 mL
2. 25 mL Lösung 1 auf 50 mL
3. 5 mL Stammlösung auf 50 mL
4. 25 mL Lösung 3 auf 50 mL
5. 1 mL Lösung 4 auf 50 mL

Die Lösungen und Wasser als Anfangslösung werden in Bechergläser mit den Nummern 0 bis 6 gegeben. Ein Spülen mit Wasser und ein Rückverkosten ist nicht gestattet. Die Probanden verkosten mit aufsteigender Konzentration und bestimmen die Reizschwelle sowie die Bitterkeitserkennungsschwelle der Substanz bzw. Fraktion. Ferner sind sie aufgefordert etwaig auftretende Nebengeschmacksarten zu benennen. Für die Mischungen werden die Diketopiperazine in gleichen Teilen zusammengemischt.

4.7 Isolierung von Feruloyl-Chinasäuren aus Rohkaffee

Zur Synthese der Feruloyl-Chinasäurelactone über die Modellröstung der Feruloyl-Chinasäure muß diese, da sie käuflich nicht zu erwerben ist, aus Rohkaffee isoliert werden. *Coffea Canephora* var. *Robusta* weisen höhere Gehalte an Chlorogensäuren als *Coffea Arabica* Varietäten auf (Clarke und Macrea, 1985), sodaß für die Isolierung ein Ivory Coast Robusta verwendet wird. Der gemahlene Rohkaffee wird mit kaltem Wasser extrahiert (250 mL Wasser auf 5 g Rohkaffee), filtriert und gefriergetrocknet. Der gefriergetrocknete Extrakt wird direkt zur semipräparativen RP-HPLC Trennung eingesetzt. Probenkonzentration ca 50 mg/mL (gelöst in Methanol/Wasser 1:1 (v/v)). Verwendet wird der unter 4.2.1.2 angegebene Gradient. Ein Chromatogramm der erzielten Trennung kann Anhang XIX entnommen werden. Neben dem Isomeren-Gemisch der Feruloyl-Chinasäuren (Fraktion 4) werden folgende weitere Verbindungen isoliert. Die Isomerie der Verbindungen wird nicht untersucht.

Fraktion	Substanz	Retentionszeit [min]	Auswaage [mg]
1	Caffeoyl-Chinasäure	18,4	6,9
2	Caffeoyl-Chinasäure	25,4	50,1
3	Coffein	31,3	10,7
4	Feruloyl-Chinasäuren	33,2	22,6
5+6	diCaffeoyl-Chinasäuren	37,7/39,5	5,2
7	diCaffeoyl-Chinasäuren	44,5	4,7
8	Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäure	48,8	5,4
9	Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäure	55,3	1,7

5 Anhang

Anhang I Ausbeuten der Rohkaffee-Protein Isolierung; Prozentangaben jeweils auf die vorherige Fraktion bezogen

Fraktion	Ausbeuten [%]	Mittlere Ausbeute [%]	Spannweite* [%]
Kaltwasserextrakt	22,8-26,2	24,3	3,4
Acetonfällung	21,5-25,4	23,0	3,9
Gereinigte Acetonfällung	92,1-97,7	95,0	5,6
Rohkaffee-Proteine	85,3-94,2	90,0	8,9

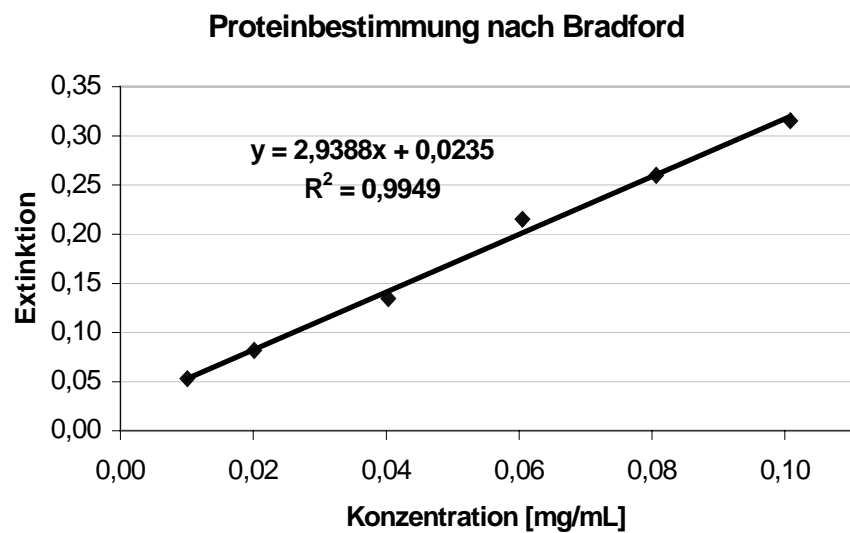
*Doerffel (1987)

Anhang II Proteingehalte der Fraktionen der Rohkaffee-Protein Isolierung

1. Proteinbestimmung nach Bradford

Kalibriergerade Bradford

c [mg/mL]	Extinktion
0,01008	0,0531
0,02016	0,0818
0,04032	0,1345
0,06048	0,2152
0,08064	0,2598
0,1008	0,3153



Proteingehalte der Fraktionen der Rohkaffee-Protein Isoierung

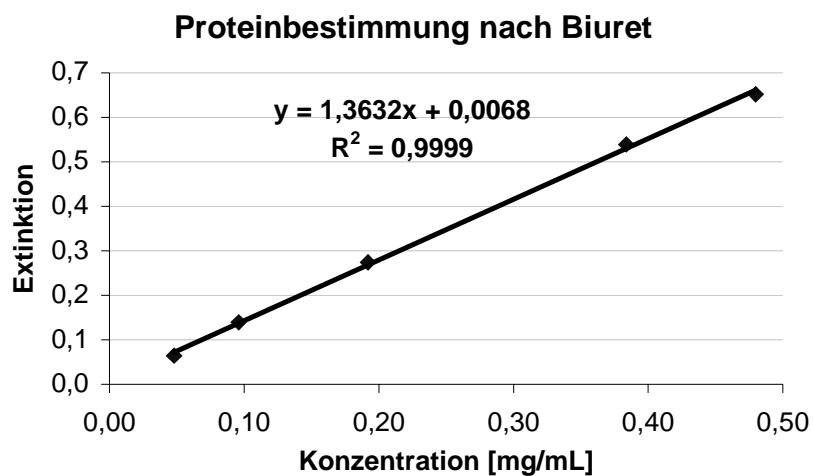
Fraktion	Gehalte [%]	Mittlerer Gehalt [%]	Spannweite* [%]
Kaltwasserextrakt	18,5-22,3	21	3,8
Acetonfällung	82,2-88,1	85	5,9
Gereinigte Acetonfällung	83,5-89,2	86	5,7
Rohkaffee-Proteine	88,7-93,4	90	4,7

*Doerffel (1987)

2. Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode

Kalibriergerade Biuret

c [mg/mL]	Extinktion
0,04798	0,0645
0,09596	0,1397
0,19192	0,2742
0,38384	0,5390



Proteingehalte der Fraktionen der Rohkaffee-Protein Isoierung

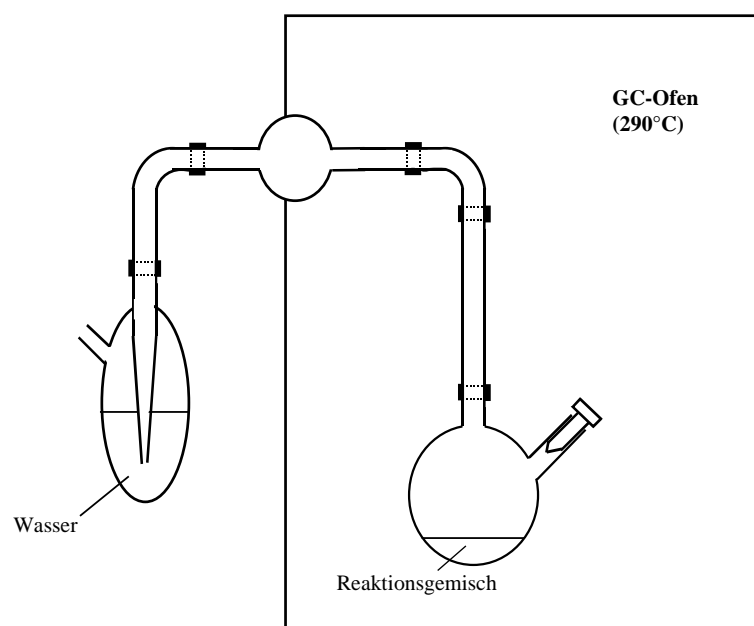
Fraktion	Gehalte [%]	Mittlerer Gehalt [%]	Spannweite* [%]
Kaltwasserextrakt	20,4-25,3	23	4,9
Acetonfällung	82,4-89,2	87	6,8
Gereinigte Acetonfällung	85,4-90,6	88	5,2
Rohkaffee-Proteine	88,4-94,5	91	6,1

*Doerffel (1987)

Anhang III Röstung der isolierten Rohkaffee-Proteine und Extrakt-Ausbeuten der Heisswasserextrakte

Röstung der isolierten Rohkaffee-Proteine	
Röstzeit 8 min	
Röstverlust [%]	Mittlerer Röstverlust [%]
12,4-17,7	15,0
Heisswasserextrakt der gerösteten Proteine	
Extraktausbeute [%]	Mittlere Extraktausbeute [%]
15,7-24,4	20,5

Schematische Zeichnung des verwendeten Modellrösters



Anhang IV Fraktionierung der gerösteten Rohkaffee-Proteine über Sephadex G10

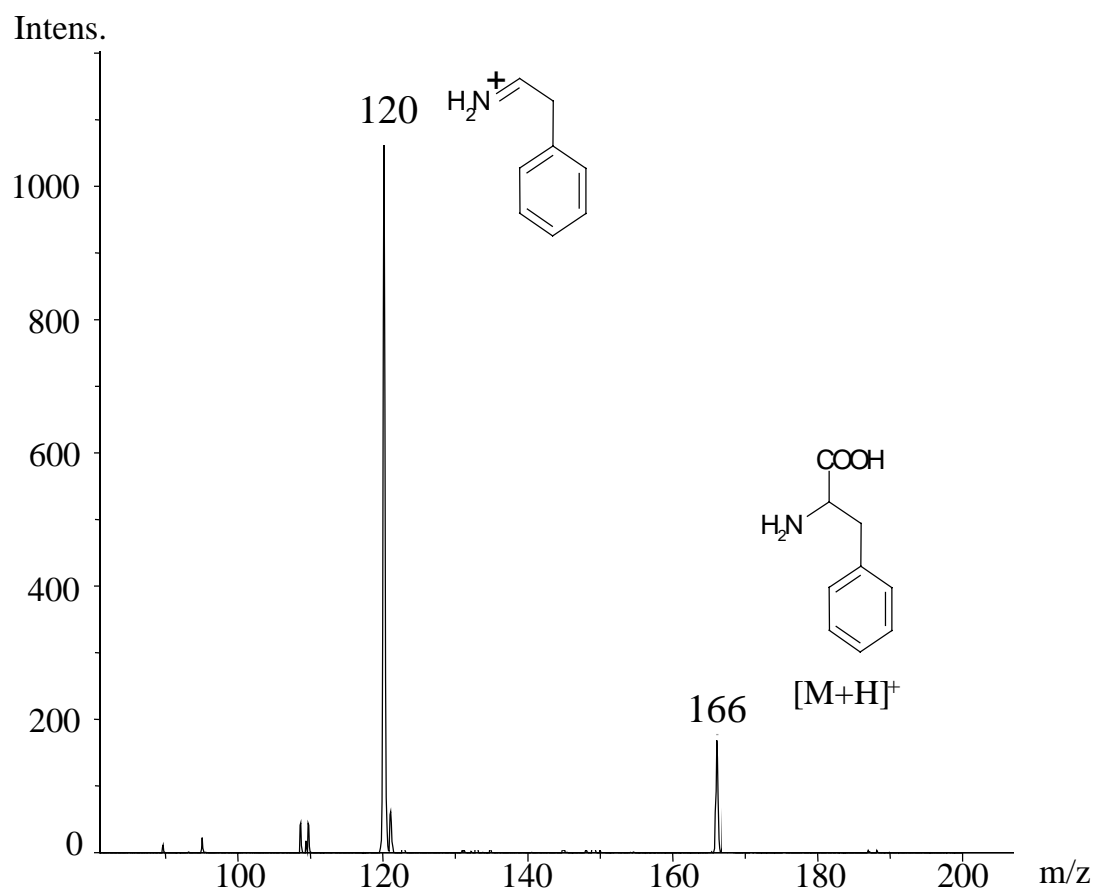
Fraktion	Ausbeuten [%]	Mittlere Ausbeute [%]	Spannweite* [%]
I	0,8-2,5	1,5	1,7
II	25,0-28,9	25,6	3,9
III	35,1-40,7	36,9	5,6
IV	12,6-21,5	16,4	8,9
V	2,4-5,6	3,0	3,2
VI	0,5-2,5	1,5	2,0
VII	0,1-1,5	0,5	1,4
VIII	0-1,3	0,1	1,3
Summe	81,1-90,5	86	9,4

*Doerffel (1987)

Anhang V MS/MS-Spektren einiger über Spritzen-MS analysierten Aminosäuren

Aminosäure	Molekülmasse [g/mol]	Quasi-Molekülion [M+H] ⁺	MS/MS-Hauptfragment [m/z]
L-Isoleucin	131	132	86
L-Leucin	131	132	86
L-Phenylalanin	165	166	120
L-Prolin	115	116	70
L-Valin	117	118	72

MS/MS-Spektrum von L-Phenylalanin



Anhang VI Ausbeuten der allgemeinen Röstkaffee-Fraktionierung

Fraktion	Ausbeuten [%]	Mittlere Ausbeute [%]	Spannweite* [%]
Heisswasserextrakt	24,8-26,9	26	2,1
Methanolextrakt	52,3-56,8	54	4,5
Wasser-Eluat Polyamidsäule	67,5-75,3	72	7,8
Methanol-Eluat Polyamidsäule	7,4-10,9	9	3,5

* Doerffel (1987)

Anhang VII Spannweite R, Standardabweichung s und Variationskoeffizient VK der Diketopiperazin-Quantifizierung

Flächen der Diketopiperazin-Mischstandards bei wiederholter Injektion

Substanz	Konzentration [mg/mL]	Flächen [$\times 10^7$]	Spannweite R* [$\times 10^5$]
cis-cyclo(Pro-Ile)	0,0163	114-120	60
cis-cyclo(Pro-Leu)	0,0157	151-155	40
cis-cyclo(Pro-Phe)	0,0144	145-150	50
cis-cyclo(Pro-Pro)	0,0178	103-107	40
cis-cyclo(Pro-Val)	0,0156	98-105	60

Standardabweichung s und Variationskoeffizient VK für die Bestimmung der Diketopiperazine in einem Handelskaffee (N = 10)

Substanz	Standardabweichung s* [mg/kg]	Variationskoeffizient VK* [%]
cis-cyclo(Pro-Ile)	1,8	2,9
cis-cyclo(Pro-Leu)	1,4	2,1
cis-cyclo(Pro-Phe)	0,5	6,2
cis-cyclo(Pro-Pro)	0,9	3,5
cis-cyclo(Pro-Val)	1,9	5,3

* Doerffel (1987)

**Anhang VIII Diketopiperazin-Gehalte in Handelskaffees,
entcoffiniertem Kaffee und Espresso [mg/50g]**

Substanz	Kaffee 1	Kaffee 2	Kaffee 3	Kaffee 4	Kaffee 5 entcoffiniert	Kaffee 6 Espresso	Kaffee 7 Espresso
cyclo(Pro-Pro)	0,89	1,01	0,95	0,91	0,80	3,03	2,85
trans-cyclo(Pro-Val)	0,37	0,45	0,38	0,38	0,25	2,15	2,10
cis-cyclo(Pro-Val)	1,10	1,24	1,17	1,20	0,98	1,84	1,79
trans-cyclo(Pro-Ile)	0,48	0,62	0,64	0,59	0,20	1,0	1,51
cis-cyclo(Pro-Ile)+ trans-cyclo(Pro-Leu)	1,69	1,82	1,85	1,81	1,04	4,50	5,24
cis-cyclo(Pro-Leu)	1,80	2,15	2,14	2,01	1,30	4,33	4,70
trans-cyclo(Pro-Phe)	0,12	0,18	0,16	0,17	0,05	0,75	0,61
cis-cyclo(Pro-Phe)	0,25	0,29	0,28	0,32	0,21	0,40	0,28

Anhang IX Diketopiperazin-Gehalte der Röstserie Brazil Arabica [mg/50g]

Substanz	Rösttemperatur [°C]						
	150	180	210	250	280	300	330
cyclo(Pro-Pro)	n.b.	0,1	0,4	0,55	0,89	1,85	2,3
trans-cyclo(Pro-Val)	n.b.	n.b.	n.b.	0,36	0,61	0,8	1,5
cis-cyclo(Pro-Val)	n.b.	0,15	0,45	0,68	1,20	1,31	1,30
trans-cyclo(Pro-Ile)	n.b.	n.b.	0,54	0,73	1,54	2,44	5,72
cis-cyclo(Pro-Ile) + trans-cyclo(Pro-Leu)	0,10	0,64	1,57	1,90	3,16	4,58	6,70
cis-cyclo(Pro-Leu)	0,56	1,57	2,21	2,57	2,68	2,53	2,60
trans-cyclo(Pro-Phe)	n.b.	n.b.	n.b.	0,05	0,34	0,60	1,88
cis-cyclo(Pro-Phe)	n.b.	0,05	0,35	0,46	0,53	0,51	0,57

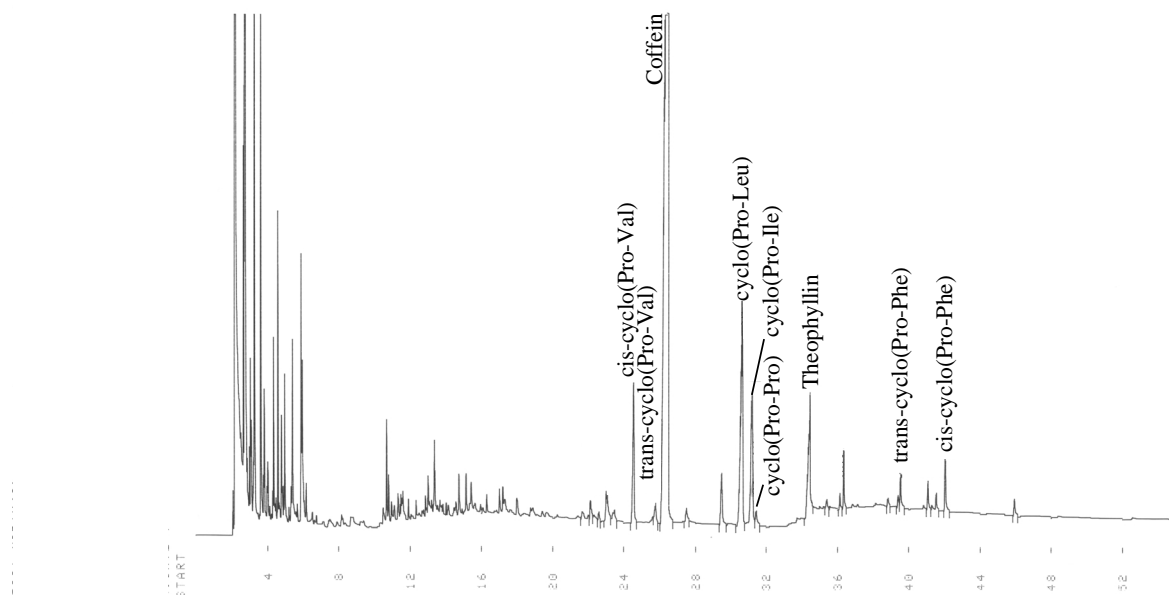
Anhang X Methoden-Daten der Diketopiperazin-Bestimmung mit GC-FID

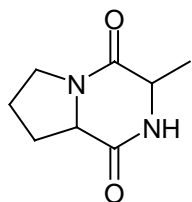
Flächen und Response-Faktor der Diketopiperazin-Mischstandards bei wiederholter Injektion

Substanz	Retentionszeit [min]	Konzentration [mg/mL]	Flächen [$\times 10^4$]	Spannweite R* [$\times 10^3$]	Response-Faktor
Myristinsäuremethylester	30,8	0,646	59-61	20	1,00
cis-cyclo(Pro-Val)	32,5	0,230	8,6-9,1	5	0,41
cis-cyclo(Pro-Leu)	41,9	0,210	9,2-9,6	4	0,49
cis-cyclo(Pro-Ile)	42,4	0,210	7,1-7,5	4	0,38
cis-cyclo(Pro-Pro)	43,3	0,195	4,2-4,7	3	0,25
cis-cyclo(Pro-Phe)	56,4	0,202	7,1-7,3	2	0,39

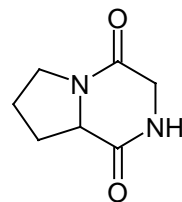
Anhang XI Bestimmung von Diketopiperazinen mit GC-FID

Substanz	Kaffee 1	Kaffee 2	Kaffee 3	Kaffee 4	Kaffee 5 entcoffeiniert	Kaffee 6 Espresso	Kaffee 7 Espresso
trans-cyclo(Pro-Val)	0,39	0,49	0,42	0,43	0,28	2,35	2,33
cis-cyclo(Pro-Val)	1,26	1,32	1,29	1,30	1,01	1,97	1,86
Summe cyclo(Pro-Leu), cyclo(Pro-Ile) und cyclo(Pro-Pro)	5,01	5,62	5,84	5,67	3,92	14,98	15,03
trans-cyclo(Pro-Phe)	0,20	0,25	0,24	0,23	0,08	0,89	0,75
cis-cyclo(Pro-Phe)	0,25	0,29	0,28	0,32	0,29	0,51	0,35

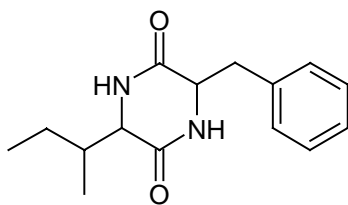
Chromatogramm eines Handelskaffees

Anhang XII weitere Diketopiperazine in Röstkaffee

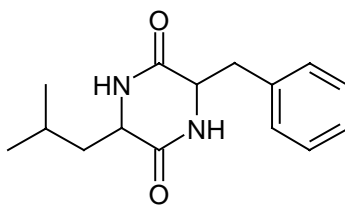
cyclo(Pro-Ala)



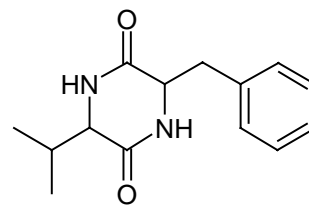
cyclo(Pro-Gly)



cyclo(Phe-Ile)



cyclo(Phe-Leu)



cyclo(Phe-Val)

Anhang XIII Spektroskopische Daten der synthetisierten Diketopiperazine**cis-cyclo(Pro-Ala)**

(3S,6S)-3-Methylhexahydropyrrol-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 168 \text{ g/mol}$)

(Ausbeute der chemischen Synthese 43,4 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei $169 \text{ m/z} = [\text{M}+\text{H}]^+$; MS/MS von 169 m/z (%) = 152 m/z (13,7), 141 (21,1), 125 (4,2), 113 (4,2), 96 (10,5) 70 (100)

EI-MS 168 m/z (%) = 168 (68,1), 152 (5,5), 140 (12,5), 125 (37,5), 97 (33,3), 70 (100), 55 (9,7)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,45$ (d, 3H, CH_3), $1,70$ - $2,20$ (m, 3H, CH_2), $2,20$ - $2,38$ (m, 1H, CH_2), $3,40$ - $3,66$ (m, 2H, CH_2), $4,00$ - $4,16$ (m, 2H, $2\times\text{CH}$), $6,70$ (s, breit, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 15,900$ (CH_3), $22,721$; $28,133$; $45,391$ ($3\times\text{CH}_2$), $51,166$; $59,242$ ($2\times\text{CH}$), $166,365$; $170,413$ ($2\times\text{CO}$)

trans-cyclo(Pro-Ala)

(3S,6R)-3-Methylhexahydropyrrol-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 168 \text{ g/mol}$)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Pro-Ala)

EI-MS 168 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Pro-Ala)

cis-cyclo(Pro-Ile)

(3S,6S)-3-(2-MethylPropyl)hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 210 \text{ g/mol}$)

(Ausbeute der chemischen Synthese 5,0 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei $211 \text{ m/z} = [\text{M}+\text{H}]^+$; MS/MS von 211 m/z (%) = 211 m/z (1,1), 194 (37,4), 183 (100), 166 (20,7), 155 (14,7), 138 (37,0), 128 (3,0), 114 (6,2), 96 (1,4), 86 (6,0), 70 (62,7)

EI-MS 210 m/z (%) = 154 (90), 125 (12), 124 (10), 96 (7), 86 (18), 70 (100), 55 (15), 43 (19), 41 (14)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0,89$ (d, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 3H, CH_3), $1,09$ (d, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 3H, CH_3), $1,40$ - $2,35$ (m, 4H, $4\times\text{CH}_2$), $3,4$ - $3,75$ (m, 1H, CH), $3,96$ - $4,40$ (m, 2H $2\times\text{CH}$)

trans-cyclo(Pro-Ile)

(3S,6R)-3-(2-MethylPropyl)hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 210 \text{ g/mol}$)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Pro-Ile)

EI-MS 210 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Pro-Ile)

cis-cyclo(Pro-Leu)

(3S,6S)-3-(2-MethylPropyl)hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 210 \text{ g/mol}$)

(Ausbeute der chemischen Synthese 5,0 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei $211 \text{ m/z} = [\text{M}+\text{H}]^+$; MS/MS von 211 m/z (%) = 211 m/z (1,1), 194 (37,4), 183 (100), 166 (20,7), 155 (14,7), 138 (37,0), 128 (3,0), 114 (6,2), 96 (1,4), 86 (6,0), 70 (62,7)

EI-MS 210 m/z (%) = 154 (90), 125 (12), 124 (10), 96 (7), 86 (18), 70 (100), 55 (15), 43 (19), 41 (14)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0,96$ (d, $J = 6,6 \text{ Hz}$, 3H, CH_3), 1,01 (d, $J = 6,6 \text{ Hz}$, 3H, CH_3), 1,45-2,41 (4m, 7H, $3\times\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,37-3,80 (m, 2H, CH_2), 3,96-4,40 (m, 2H $2\times\text{CH}$)

trans-cyclo(Pro-Leu)

(3S,6R)-3-(2-MethylPropyl)hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 210 \text{ g/mol}$)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Pro-Leu)

EI-MS 210 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Pro-Leu)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): siehe cis-cyclo(Pro-Leu)

cis-cyclo(Pro-Phe)

(3S,6S)-3-Benzylhexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 244 \text{ g/mol}$)

(Ausbeute der chemischen Synthese 42,1 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei $245 \text{ m/z} = [\text{M}+\text{H}]^+$; MS/MS von 245 m/z (%) = 245 (0,1), 228 (3,6), 217 (89,9), 200 (6,3), 172 (32,9), 154 (7,8), 131 (10,2), 120 (100), 103 (6,9)

EI-MS 244 m/z (%) = 244 (30), 153 (48), 125 (100), 91 (45), 70 (70), 43 (10), 41 (28), 28 (27)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1,79$ -2,10 (m, 3H, CH_2), 2,10-2,58 (m, 1H, CH_2), 2,79 (dd, 1H, CH_2), 3,41-3,79 (m, 3H, CH_2), 4,00-4,20 (m, 1H, CH), 4,30 (dd, 1H CH), 5,65 (s, breit, 1H, NH), 7,05-7,40 (m, 5H, arom.-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 22,519$; 28,343; 36,833; 45,429 ($4\times\text{CH}_2$), 56,192; 59,126 ($2\times\text{CH}$), 127,518; 128,572; 129,102; 129,244; 135,983 (aromat.-C), 165,052; 169,307 ($2\times\text{CO}$)

trans-cyclo(Pro-Phe)

(3S,6R)-3-Benzylhexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 244$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 42,1 %)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Pro-Phe)

EI-MS 244 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Pro-Phe)

cis-cyclo(Pro-Val)

(3S,6S)-3-(1-Methylethyl)-hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 196$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 29,2 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei 197 m/z = $[M+H]^+$; MS/MS von 197 m/z (%) = 197 m/z (0,2), 187 (18,7), 180 (27,4), 169 (100), 152 (8,6), 141 (34,3), 124 (31,7), 70 (46,7)

EI-MS 168 m/z (%) = 196 (4), 154 (85), 125 (30), 72 (39), 70 (100), 43 (29)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0,85$ (d, 3H, CH_3), 1,05 (d, 3H, CH_3), 1,72-2,10 (m, 3H, CH_2), 2,29-2,70 (2m, 2H, CH_2 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,40-3,73 (m, 2H, CH_2), 3,85-3,95 (m, 1H, CH), 4,00-4,15 (m, 1H, 1H, CH), 6,24 (s, breit, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 16,057$; 19,075 ($2 \times \text{CH}_3$), 22,315; 28,497; 45,086 ($3 \times \text{CH}_2$), 28,432; 58,779; 60,435 ($3 \times \text{CH}$), 164,951; 170,118 ($2 \times \text{CO}$)

trans-cyclo(Pro-Val)

(3S,6R)-3-(1-Methylethyl)-hexahydropyrrolo-[1,2-a]-pyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 196$ g/mol)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei 197 m/z = $[M+H]^+$; MS/MS von 197 m/z (%) = 197 m/z (0,2), 187 (18,7), 180 (27,4), 169 (100), 152 (8,6), 141 (34,3), 124 (31,7), 70 (46,7)

EI-MS 196 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Pro-Val)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): siehe cis-cyclo(Pro-Val)

cis-cyclo(Phe-Ala)

(3S,6S)-3-Benzyl-6-methylhexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 218$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 40,5 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei 219 m/z = $[M+H]^+$; MS/MS von 219 m/z (%) = 219 (0,1), 191 (38,5), 174 (6,3), 146 (5,2), 120 (100), 103 (4,2)

EI-MS 218 m/z (%) = 218 (31,9), 181 (5,6), 162 (1,4), 127 (16,7), 99 (23,6), 91 (100), 65 (6,9)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 0,63$ (d, $J = 7,0$, 3H, CH_3), 2,99 (dd, $J = 4,7$ Hz, 4,7 Hz, 1H, CH_2Ph), 3,28 (dd, $J = 4,1$ Hz, 1H, CH_2Ph), 3,80 (q, $J = 7,4$ Hz, 1H, CHCH_3), 4,27-4,35 (m, 1H, CHCH_2), 7,10-7,29 (m, 5H, aromat.-H)

Ein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum konnte aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz in allen deuterierten Lösungsmitteln nicht aufgenommen werden.

cis-cyclo(Phe-Asp)

(3S,6S)-6-Benzyl-3-carboxymethylhexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 262$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 75,1 %)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 1,57$ (dd, $J = 7,0$ Hz, 7,0 Hz, 1H, CH_2Ph), 2,05 (dd, $J = 5,3$ Hz, 5,4 Hz, 1H, CH_2Ph), 2,93 (dd, $J = 5,0$ Hz, 5,0 Hz 1H, CH_2), 3,11 (ddd, $J = 4,6$ Hz, 4,4 Hz, 6,4 Hz 1H, CH_2), 3,98-4,11 (m, 1H, CH), 4,15-4,23 (m, 1H, CH), 7,10-7,32 (m, 5H, aromat.-H), 7,83 (s, 1H, NH), 8,08 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 37,806$; 37,975 ($2 \times \text{CH}_2$), 50, 966; 55,156 ($2 \times \text{CH}$), 126,567; 128,029; 130,036 (aromat.-C), 136,232 (COOH), 166,426; 171,348 (CO)

cis-cyclo(Phe-Ile)

(3S,6S)-3-Benzyl-6-(1-methylpropyl)-hexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 260$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 22,9 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei 261 m/z = $[\text{M}+\text{H}]^+$; MS/MS von 261 m/z (%) = 261 (0,1), 233 (55,2), 216 (27,1), 198 (2,1), 188 (14,6), 120 (100), 103 (7,3), 86 (14,6)
EI-MS 260 m/z (%) = 260 (33,3), 204 (48,6), 169 (16,7), 141 (55,6), 113 (69,4), 86 (41,7), 91 (100), 65 (9,7), 57 (13,9)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 0,51$ -0,71 (m, 1H, CH_2), 0,57 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3), 0,65 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,2-1,3 (m, 1H, CH), 1,5-1,65 (m, 1H, CH_2), 3,08 (dd, $J = 4,6$ Hz, 4,6 Hz, 1H, CH_2Ph), 3,31 (dd, $J = 5,6$ Hz, 5,6 Hz, 1H, CH_2Ph), 3,85-3,91 (m, 1H, CH), 4,40-4,44 (m, 1H, CH), 7,96-7,08 (m, 3H, aromat.-H), 7,15-7,26 (m, 2H, aromat.-H), 8,86 (s, breit, 1H, NH), 8,93 (s, breit, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 21,159$ (CH_3), 22,985; 23,895 ($2 \times \text{CH}_2$), 40,404; 44,580; 56,899 ($3 \times \text{CH}$), 126,994; 128,496; 130,695; 136,766 (aromat.-C)

trans-cyclo(Phe-Ile)

(3S,6R)-3-Benzyl-6-(1-methylpropyl)-hexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 260$ g/mol)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Phe-Ile)

EI-MS 260 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Phe-Ile)

cis-cyclo(Phe-Leu)

(3S,6S)-3-Benzyl-6-(2-methylpropyl)-hexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 260$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 22,9 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei 261 m/z = $[M+H]^+$; MS/MS von 261 m/z (%) = 261 (0,1), 233 (55,2), 216 (27,1), 198 (2,1), 188 (14,6), 120 (100), 103 (7,3), 86 (14,6)

EI-MS 260 m/z (%) = 260 (33,3), 204 (48,6), 169 (16,7), 141 (55,6), 113 (69,4), 86 (41,7), 91 (100), 65 (9,7), 57 (13,9)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 0,56\text{--}0,68$ (m, 1H, CH_2), 0,58 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3), 0,62 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3), 1,25–1,38 (m, 1H, CH), 1,55–1,72 (m, 1H, CH_2), 3,08 (dd, $J = 4,6$ Hz, 4,6 Hz, 1H, CH_2Ph), 3,31 (dd, $J = 5,6$ Hz, 5,6 Hz, 1H, CH_2Ph), 3,85–3,91 (m, 1H, CH), 4,40–4,44 (m, 1H, CH), 7,96–7,08 (m, 3H, arom.-H), 7,15–7,26 (m, 2H, arom.-H), 8,86 (s, breit, 1H, NH), 8,93 (s, breit, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) $\delta = 21,159$ (CH_3), 22,985; 23,895 ($2\times\text{CH}_2$), 40,404; 44,580; 56,899 ($3\times\text{CH}$), 126,994; 128,496; 130,695; 136,766 (aromat.-C)

trans-cyclo(Phe-Leu)

(3S,6R)-3-Benzyl-6-(2-methylpropyl)-hexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 260$ g/mol)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Phe-Leu)

EI-MS 260 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Phe-Leu)

cis-cyclo(Phe-Phe)

(3S,6S)-3,6-Bisbenzylhexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 294$ g/mol)

(Ausbeute der chemischen Synthese 49,3 %)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 2,21$ (dd, $J = 7,5$ Hz, 7,6 Hz, 2H, $2\times\text{CH}_2\text{Ph}$), 4,1 (dd, $J = 4,1$ Hz, 4,0 Hz, 2H, $2\times\text{CH}_2\text{Ph}$), 4,11 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H CH), 4,13 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H CH), 7,07–7,30 (m, 10H, arom.-H)

Ein $^{13}\text{C-NMR}$ konnte aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz in allen deuterierten Lösungsmitteln nicht aufgenommen werden.

cis-cyclo(Phe-Val)

(3S,6S)-3-Benzyl-6-(1-methylethyl)-hexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 246 \text{ g/mol}$)

(Ausbeute der chemischen Synthese 43,4 %)

ESI-MS (positiver Mode): Pseudomolekülion bei $247 \text{ m/z} = [\text{M}+\text{H}]^+$; MS/MS von 247 m/z (%) = 247 (0,2), 219 (81,3), 202 (17,8), 174 (26,1), 120 (100), 103 (52,1)

EI-MS 246 m/z (%) = 246 (47,2), 204 (9,7), 175 (4,2), 155 (18,1), 127 (47,2), 113 (18,1), 91 (100), 72 (11,1), 57 (8,3)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 2,02$ (d, 3H, CH_3), 2,30 (d, 3H, CH_3), 3,20-3,40 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4,50-4,90 (m, 3H, CH_2Ph , CH), 5,00-5,29 (1H, CH), 5,00-5,29 (m, 5H, aromat.-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): $\delta = 17,324$; 19,263 ($2\times\text{CH}_3$), 33,194 (CH_2), 40 570; 57,281; 61,252 ($3\times\text{CH}$), 127, 949; 129, 454; 130, 457; 131, 308 (aromat.-C)

trans-cyclo(Phe-Val)

(3S,6R)-3-Benzyl-6-(1-methylethyl)-hexahydropyrazin-1,4-dion ($M_{\text{rel}} = 246 \text{ g/mol}$)

ESI-MS (positiver Mode): siehe cis-cyclo(Phe-Val)

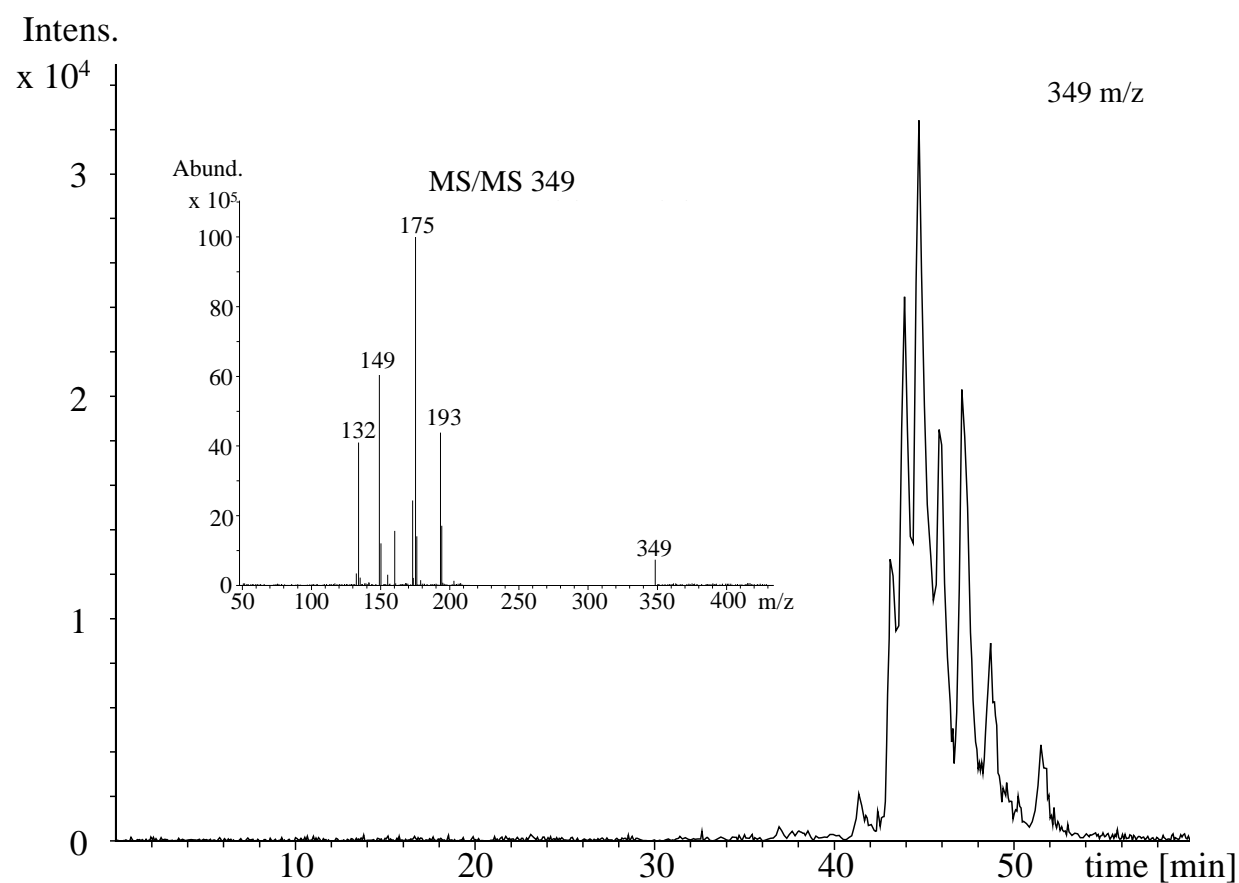
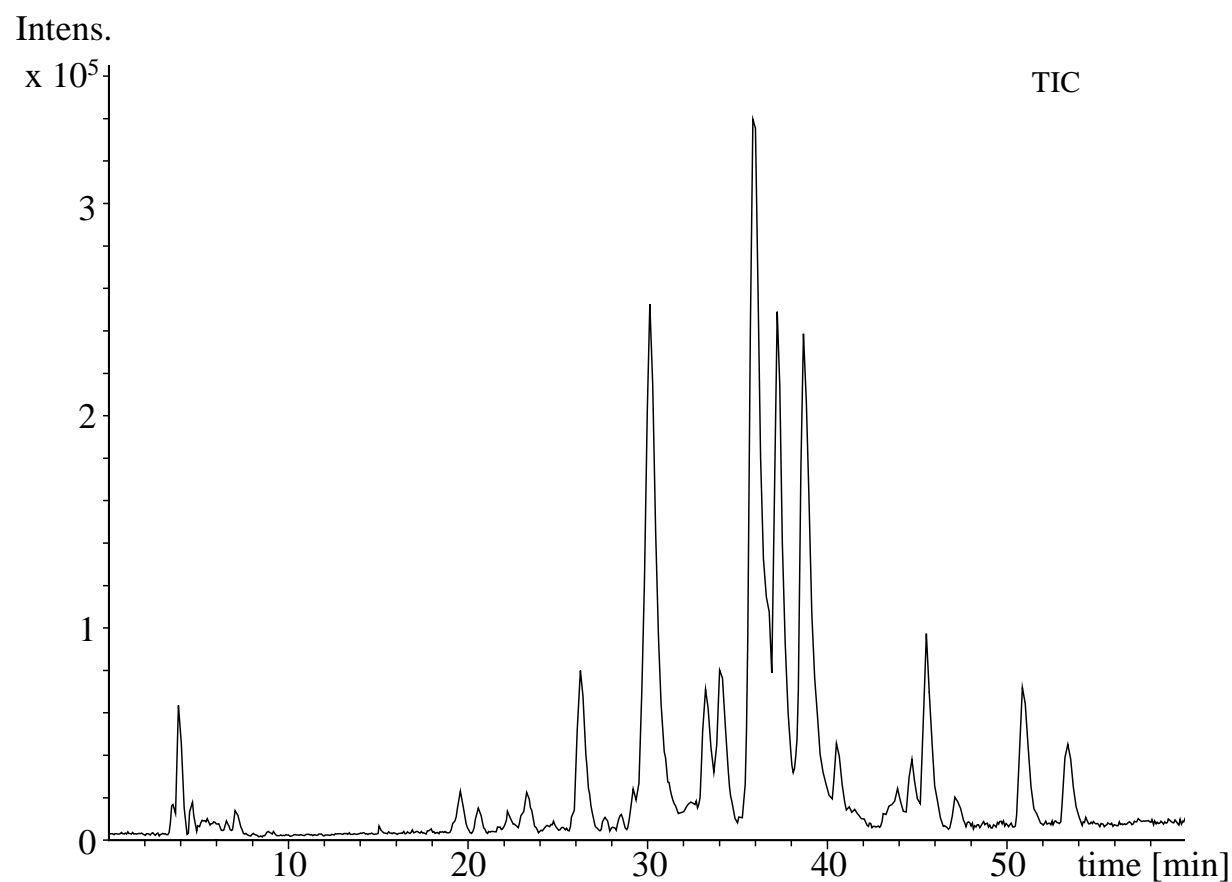
EI-MS 246 m/z (%) = siehe cis-cyclo(Phe-Val)

Anhang XIV Fraktionierung des Methanol-Eluats der Polyamidsäule über Sephadex G10

Fraktion	Ausbeute [%]	Mittlere Ausbeute [%]	Spannweite* [%]
I	0-1,5	0,5	1,5
II	3,7-6,2	5	2,5
III	11,5-13,4	10	1,9
IV	23,2-26,8	25	3,6
V	11,6-13,8	13	2,2
VI	25,1-28,3	27	3,2
VII	14,1-16,5	15	2,4
VIII	0,9-2,5	2	1,6
Summe		97,5	

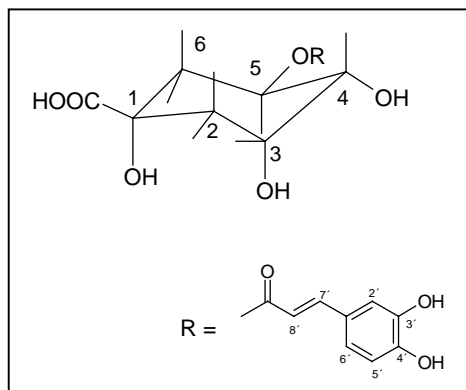
* Doerffel (1987)

Anhang XV LC-ESI-MS Analyse (negativer Mode) der Sephadex G10 Fraktion VII
Totalionenstrom und Massenspur der Feruloyl-Chinasäurelactone
[349 m/z]



Anhang XVI Spektroskopische Daten der 5-Caffeoyl-Chinasäure und der Caffeoyl-Chinasäurelactone

5-Caffeoyl-(-)-Chinasäure ($M_{\text{rel}} = 354 \text{ g/mol}$)

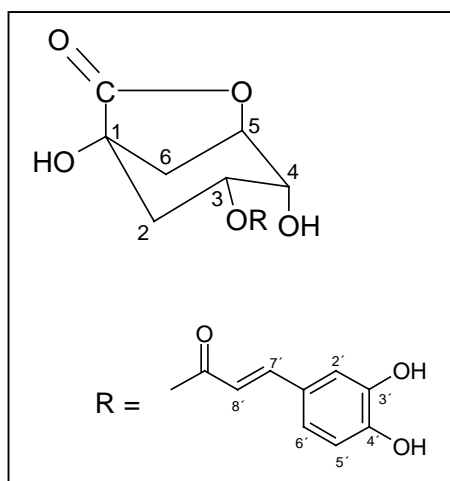


UV (MeOH): λ_{max} 230, 305, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): Pseudomolekülion bei 353 $m/z = [M-H]^-$; MS/MS von 353 m/z (rel. Int. %) = 353 (10), 335 (100)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,05-2,3 (4 H, m, H2ax, H2eq, H6ax, H6eq), 3,75 (1 H, dd, $J = 9,1 \text{ Hz}$, H4ax), 4,18 (1 H, ddd, $J = 3,0 \text{ Hz}$, H3eq), 5,35 (1 H, ddd, $J = 4,7 \text{ Hz}$, H5ax), 6,30 (1 H, d, H8'), 6,78 (1 H, d, H5'), 6,98 (1 H, dd, H6'), 7,58 (1 H, d, H7')

3-Caffeoyl- γ -Chinid ($M_{\text{rel}} = 336 \text{ g/mol}$)



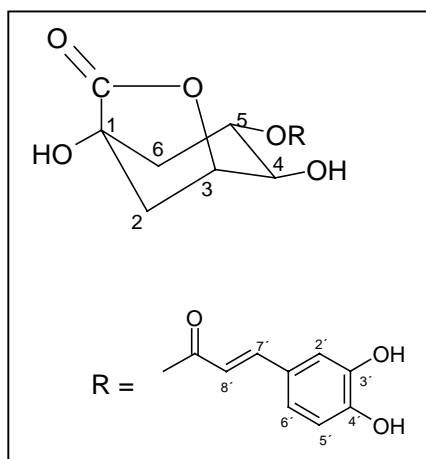
Herkunft: Isomer 2 der Lactonfraktion der 5-CQA-Röstung

UV (MeOH): λ_{max} 243, 305, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): Pseudomolekülion bei 335 $m/z = [M-H]^-$; MS/MS von 335 m/z (rel. Int. %) = 335 (5), 179 (12), 173 (100), 161 (10), 135 (7)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,12-2,20 (2 H, m, H2ax, H2eq), 2,35 (1 H, m, H6eq), 2,58 (1 H, d, H6ax), 4,32 (1 H, dd, $J = 4,6, 4,3 \text{ Hz}$, H4eq), 4,79 (1 H, dd, $J = 6,0, 4,6 \text{ Hz}$, H5eq), 4,95 (1 H, ddd, $J = 11,6, 4,3, 6,8 \text{ Hz}$, H3ax), 6,30 (1 H, d, H8'), 6,80 (1 H, d, H5'), 7,00 (1 H, dd, H6'), 7,10 (1 H, d, H2'), 7,65 (1 H, d, H7')

5-Caffeoyl- γ -Chinid ($M_{\text{rel}} = 336 \text{ g/mol}$)

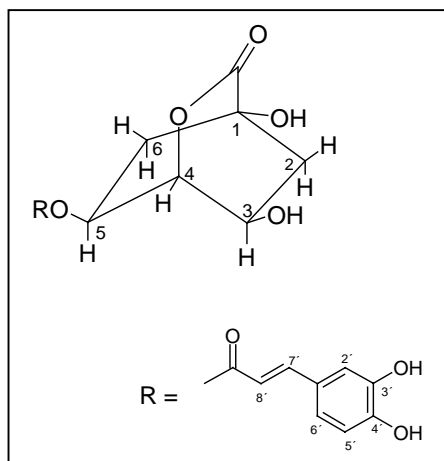


Herkunft: Isomer 3 der Lactonfraktion der 5-CQA-Röstung

UV (MeOH): λ_{max} 243, 305, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): s.o.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,12-2,20 (2 H, m, H2ax, H2eq), 2,35 (1 H, m, H6eq), 2,58 (1 H, d, H6ax), 4,15 (1 H, dd, $J = 5,1, 1,3 \text{ Hz}$, H4ax), 4,80 (1 H, dd, $J = 5,2, 1,4 \text{ Hz}$, H3eq), 5,10 (1 H, d, $J = 3,9 \text{ Hz}$, H5ax), 6,27 (1 H, d, H8'), 6,78 (1 H, d, H5'), 6,98 (1 H, dd, H6'), 7,05 (1 H, d, H2'), 7,62 (1 H, d, H7')

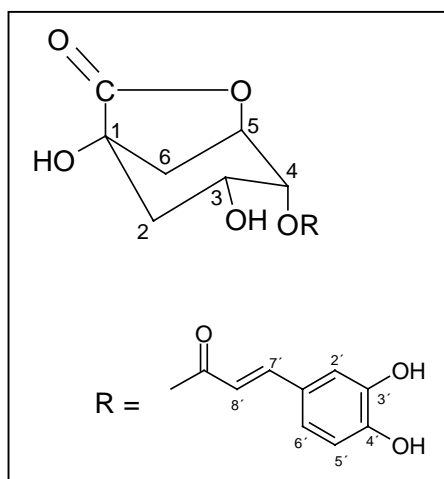
5-Caffeoyl-4- δ -Chinid ($M_{\text{rel}} = 336 \text{ g/mol}$)

Herkunft: Isomer 4 der Lactonfraktion der 5-CQA-Röstung

UV (MeOH): λ_{max} 243, 305, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): s.o.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 1,74-1,84 (2H, m, H6ax, H6eq), 2,32-2,54 (2 H, m, H2ax, H2eq), 4,48 (1 H, ddd, $J = 9,1 \text{ } 3,0 \text{ } 1,7 \text{ Hz}$, H4eq), 4,71 (1 H, dd, $J = 4,4 \text{ } 1,5 \text{ Hz}$, H4eq), 5,25 (1 H, ddd, $J = 9,99 \text{ } 4,30 \text{ Hz}$, H5ax), 6,28 (1 H, d, H8'), 6,80 (1 H, d, H5'), 6,95 (1 H, dd, H6'), 7,08 (1 H, d, H2'), 7,60 (1 H, d, H7')

4-Caffeoyl- γ -Chinid ($M_{\text{rel}} = 336 \text{ g/mol}$)

Herkunft: Isomer 5 der Lactonfraktion der 5-CQA-Röstung

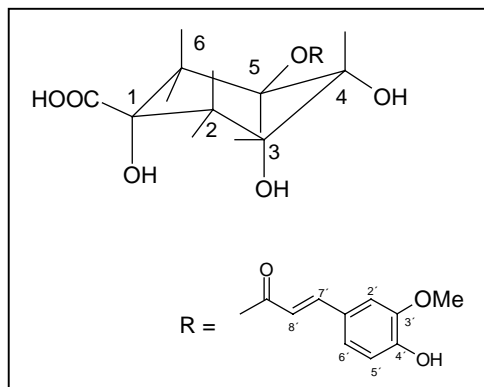
UV (MeOH): λ_{max} 243, 305, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): s.o.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,12-2,20 (2 H, m, H2ax, H2eq), 2,35 (1 H, m, H6eq), 2,58 (1 H, d, H6ax), 3,98 (1 H, dd, $J = 11,7 \text{ } 6,5 \text{ } 4,9 \text{ Hz}$, H3ax), 4,89 (1 H, dd, $J = 5,7 \text{ } 4,4 \text{ Hz}$, H5eq), 5,30 (1 H, ddd, $J = 4,9 \text{ } 4,5 \text{ Hz}$, H4eq), 6,30 (1 H, d, H8'), 6,78 (1 H, d, H5'), 6,98 (1 H, dd, H6'), 7,10 (1 H, d, H2'), 7,65 (1 H, d, H7')

Anhang XVII Spektroskopische Daten der 5-Feruloyl-Chinasäure und der isolierten Feruloyl-Chinasäurelactone

5-Feruloyl-(-)-Chinasäure (Kiehne, 1996) ($M_{\text{rel}} = 368 \text{ g/mol}$)

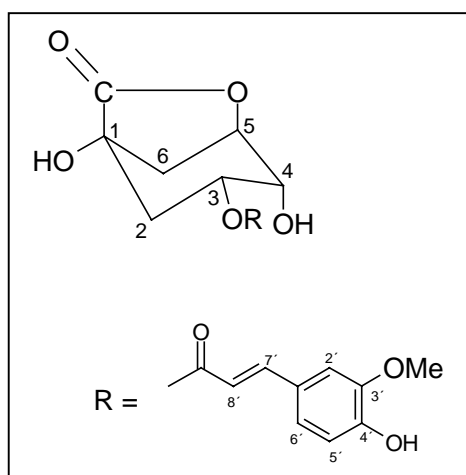


UV (MeOH): λ_{max} 235, 300, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): Pseudomolekülon bei 367 $m/z = [\text{M}-\text{H}]^-$; MS/MS von 367 m/z (rel. Int. %) = 353 (10), 349 (100)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,0-2,25 (4 H, m, H2ax, H2eq, H6ax, H6eq), 3,72 (1 H, dd, $J = 8,7 \text{ Hz}$, H4ax), 4,16 (1 H, m, $J = 3,0 \text{ Hz}$, H3eq), 5,34 (1 H, ddd, $J_1 = 8,8, 4,2 \text{ Hz}$, H5ax), 6,37 (1 H, d, H8'), 6,81 (1 H, d, H5'), 7,08 (1 H, dd, H6'), 7,62 (1 H, d, H7')

3-Feruloyl - γ -Chinid ($M_{\text{rel}} = 350 \text{ g/mol}$)



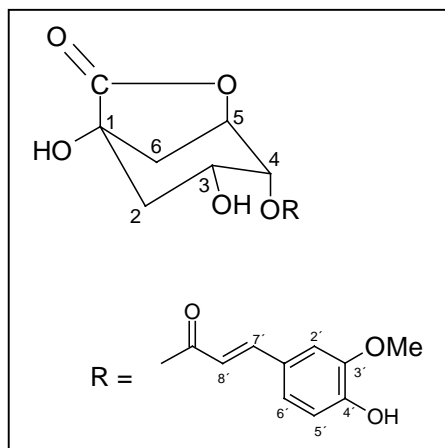
Herkunft: Isomer 2 der Lactonfraktion der FQA-Röstung

UV (MeOH): λ_{max} 240, 300, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): Pseudomolekülon bei 349 $m/z = [\text{M}-\text{H}]^-$; MS/MS von 349 m/z (rel. Int. %) = 349 (10), 193 (40), 175 (100), 149 (60), 132 (35)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,12-2,20 (2 H, m, H2ax, H2eq), 2,35 (1 H, m, H6eq), 2,58 (1 H, d, H6ax), 4,32 (1 H, dd, $J = 4,6, 4,3 \text{ Hz}$, H4eq), 4,79 (1 H, dd, $J = 6,0, 4,6 \text{ Hz}$, H5eq), 4,95 (1 H, ddd, $J = 11,6, 4,3, 6,8 \text{ Hz}$, H3ax), 6,30 (1 H, d, H8'), 6,80 (1 H, d, H5'), 7,00 (1 H, dd, H6'), 7,10 (1 H, d, H2'), 7,65 (1 H, d, H7')

4-Feruloyl - γ -Chinid ($M_{\text{rel}} = 350 \text{ g/mol}$)



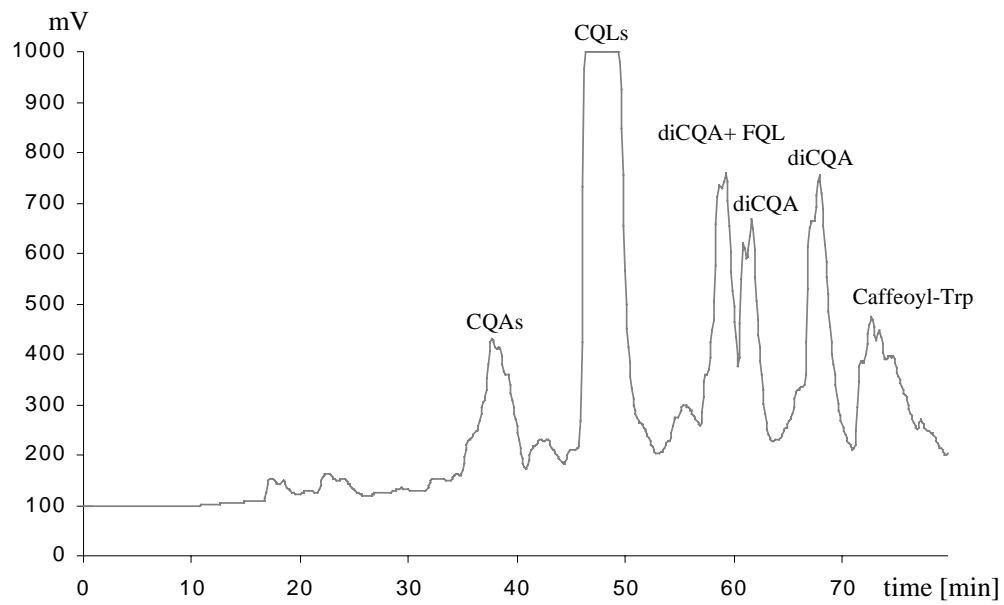
Herkunft: Isomer 5 der Lactonfraktion der FQA-Röstung

UV (MeOH): λ_{max} 240, 300, 330 nm

ESI-MS (negativer Mode): s.o.

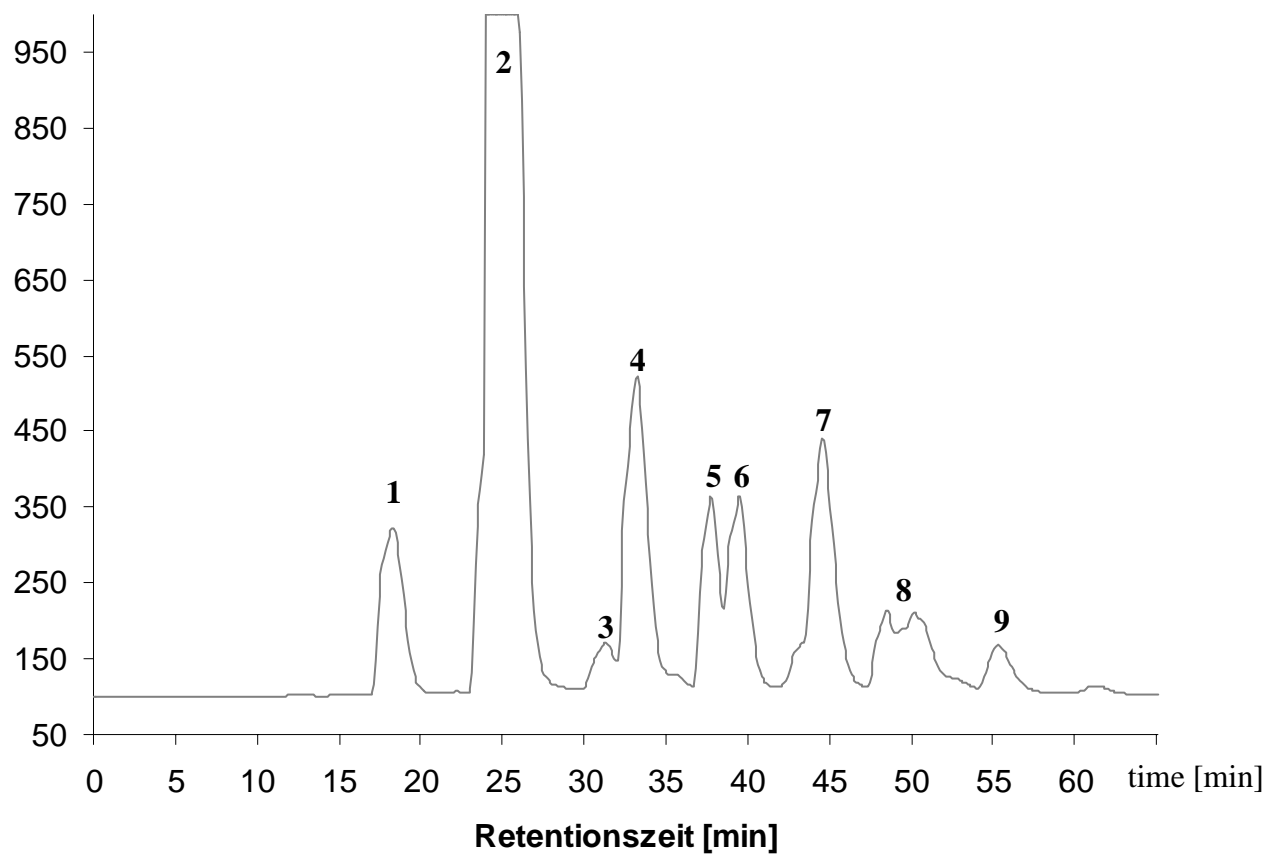
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,12-2,20 (2 H, m, H2ax, H2eq), 2,35 (1 H, m, H6eq), 2,58 (1 H, d, H6ax), 3,98 (1 H, dd, $J = 11,7, 6,5, 4,9 \text{ Hz}$, H3ax), 4,89 (1 H, dd, $J = 5,7, 4,4 \text{ Hz}$, H5eq), 5,30 (1 H, ddd, $J = 4,9, 4,5 \text{ Hz}$, H4eq), 6,30 (1 H, d, H8'), 6,78 (1 H, d, H5'), 6,98 (1 H, dd, H6'), 7,10 (1 H, d, H2'), 7,65 (1 H, d, H7')

Anhang XVIII Isolierte Chlorogensäuren und Chlorogensäure-Derivate aus dem Ethylacetat-Extrakt der alternativen Röstkaffee-Fraktionierung



Anhang XIX Isolierung der Feruloyl-Chinasäuren aus Rohkaffee

Chromatogramm des Kaltwasserextrakts aus Rohkaffee (Ivory Coast Robusta)



Fraktion	Substanz	Retentionszeit [min]	Auswaage [mg]
1	Caffeoyl-Chinasäure	18,4	6,9
2	Caffeoyl-Chinasäure	25,4	50,1
3	Coffein	31,3	10,7
4	Feruloyl-Chinasäuren	33,2	22,6
5+6	diCaffeoly-Chinasäuren	37,7/39,5	5,2
7	diCaffeoyl-Chinasäuren	44,5	4,7
8	Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäure	48,8	5,4
9	Caffeoyl-Feruloyl-Chinasäure	55,3	1,7

6 Literatur

Adler-Nissen J. (1988): Bitterness intensity of protein hydrolyzates – chemical and organoleptic characterization; in G. Charalambous (Hrsg.): *Frontiers of Flavor - Proceedings of the 5th international flavor conference*; Elsevier Science Publishers London, S.63-77.

Adler-Nissen J. (1986): A Review of Food Protein Hydrolysis – Specific Areas; in J. Adler-Nissen (Hrsg.): *Enzymatic Hydrolysis of Food Protein*; Elsevier Applied Science Publishers London, S.57-109.

Akabas M.H., J. Dodd und Q. Al-Awqati (1988): A bitter substance induces a rise in intracellular Calcium in a subpopulation of rat taste cells; *Science* 242, S.1047-1050.

Alaimo L.H., C.-T. Ho und J.D. Rosen (1992): Effect of Protein Glycation on Subsequent Volatile Formation; *J. Agric. Food Chem.* 40, S.280-283.

Amorim H.V. und R.V. Josephson (1975): Water soluble Protein and Nonprotein Components of Brazilian Green Coffee Beans; *J. Food Sci.* 40, S.1179-1184.

Arnold U., E. Ludwig, R. Kühn und U. Möschwitzer (1994): Analysis of free amino acids in green coffee beans; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199, S.22-25.

Arnold, U. (1995): Nachweis von Aminosäureveränderungen und Bestimmung freier Aminosäuren in Rohkaffee – Beiträge zur Charakterisierung von Rohkaffeepeptiden; Dissertation, Universität Dresden.

Aurich, H., R. Hofmann, R. Klöcking und D. Mücke (1967): Stoffe vom Huminsäuretyp in Röstkaffee-Extrakten – II.Mitteilung L-Aminosäuregehalt von Kaffee-Huminsäuren; *Z. Lebens. Unters.-Forsch* 135, S.59-64.

Baltes W. (1977): Rösteffekte auf die Kaffeezusammensetzung; 8. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Abidjan 1977, ASIC Paris 1979, S.85-96.

Bates R.P. (1970): Heat-Induced Off-Flavor in Avocado Flesh; J. Food Sci. 35, S.478-482.

Belitz H.D. (1975): Geschmacksaktive Substanzen in Kaffee ; 7. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Hamburg 1975, ASIC Bremen 1976, S.243-252.

Belitz H.D., W. Chen, H. Jugel, W. Stempfl, R. Treleano und H. Wieser (1981): Structural requirements for sweet and bitter taste; in P. Schreier (Hrsg.): Flavour`81; Walter de Gruyter Berlin, S.741-755.

Belitz H.D. und Wieser H. (1985): Bitter Compounds: occurrence and structure activity relationships; Food Rev. Int. 1, S.271-354.

Ben-et G., A. Dolev und D. Tatarsky (1973): Compounds Contributing to Heat-Induced Bitter Off-Flavor in Avocado; J. Food Sci. 38, S.546-547.

Bergmann M. und L. Zervas (1932): Ber. Dtsch. Chem. Ges. 65, a) S.1132, b) S.1992

Bernhard S.J., M. Naim, U. Zehavi und B. Lindemann (1996): Changes in IP₃ and cytosolic Ca⁺⁺ in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat; J. Physiol. 490, S.325-336.

Bettencourt A.J. und C.J. Rodrigues (1988): Principles and Practice of Coffee Breeding for Resistance to Rust and Other Diseases; in R.J. Clarke und R. Macrae (Hrsgg.): Coffee Bd 4 Agronomy, Elsevier Applied Science Publishers London, S.199-234.

Beyer H. und W. Walter (1991): Lehrbuch der organischen Chemie; 22.Auflage, S. Hirtzel Verlag, Stuttgart, a) S.288, b) S.830-833

Biggers R.E., J.J. Hilton und M.A. Giranturco (1969): Differentiation between Coffea Arabica and Coffea Robusta by computer evaluation of gas chromatographic profiles – comparison of numerically derived quality with organoleptic evaluations; J. Chromatogr. Sci. 7, S.453-472.

Blank I., A. Sen und W. Grosch (1991): Aroma Impact Compounds of Arabica and Robusta Coffee. Qualitative and Quantitative Investigations; 14. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, San Francisco 1991, ASIC Paris 1992, S.117-129.

Blank I., A. Sen und W. Grosch (1992): Potent Odorants of the Roasted Powder and Brew of Arabica Coffee; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195, S. 239-245.

Bormann T. (1999): Untersuchungen zur Bitterkeit von Kaffee – Aufbau eines Sensorik-Panels und Isolierung von Proteinen aus Rohkaffee; Wissenschaftliche Abschlußarbeit, TU Braunschweig.

Bradford M.M. (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding; Anal. Biochemie 72, S.248-254

Brand J.G. (1997): Biophysics of Taste; in G.K. Beauchamp und L. Bartoshuk (Hrsgg): Tasting and Smelling; Academic Press San Diego, S.1-24.

Breslin A.S. (1992): Interactions among salty, sour and bitter compounds; Trends in Food Science and Technology Vol.7, S.399-403.

Brieskorn C.H. (1990): Physiological and therapeutical aspects of bitter compounds; in R.L. Rouseff (Hrsg.): Bitterness in Foods and Beverages; Elsevier Science Publishers London, S.15-34.

Bruker Daltonik GmbH (1999): Esquire LC Manuals.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Bd. I/1 L 00.09-2, Raum für sensorische Prüfungen, Beuth Verlag, Berlin, 1983.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Bd. I/1 L 00.09-4, Rangordnungsprüfung, Beuth Verlag, Berlin, 1983.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Bd. I/1 L 00.09-7, Dreiecksprüfung, Beuth Verlag, Berlin, 1996.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Bd. I/1 L 00.09-9, Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit, Beuth Verlag, Berlin, 1990.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; Bd. I/1 L 00.09-10, Schulung von Prüfpersonen für sensorische Prüfungen, Beuth Verlag, Berlin, 1997.

Chen W.-C. (1979): Untersuchungen über den Bittergeschmack von Röstkaffee. Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei einigen einfachen organischen Verbindungen; Dissertation, Technische Universität München.

Clarke R.J. und R. Macrae (Hrsgg.) (1985): Coffee Vol.1: Chemistry, Elsevier Applied Science Publishers London.

Clifford M.N. (1985): Chlorogenic Acids; in R.J. Clarke und R. Macrae (Hrsgg.): Coffee Vol.1 Chemistry, Elsevier Applied Science Publishers London, S.153-202

Clifford M.N. und O. Ohiokpehai, (1983): Coffee Adstringency; Anal. Proc. 20, S.83-86

Corse, J., E. Lundin, E. Sonderheimer und A.C. Waiss JR. (1966): Conformation Analysis of D-(-)-Quinic Acid and some of its Derivatives by Nuclear Magnetic Resonance; Phytochemistry 5, S.767-776.

Czerny M., F. Mayer und W. Grosch (1999): Sensory Study on the Character Impact Odorants of Roasted Arabica Coffee; J. Agric. Food Chem. 47, S.695-699.

Dansi, A., A. Dal Pozzo, V. Mariotti, B. Bonferino und M. Piccioni (1970): Das Vorkommen gewisser cyclischer Peptide in Maisquellwasser; Stärke 22, S.305-309

Darbre A.(Hrsg.) (1986): Practical Protein Chemistry – A Handbook, John Wiley & Sons Chichester.

Dart S.K. und H.E. Nursten (1985): Volatile Components; in R.J. Clarke und R. Macrae (Hrsgg.): Coffee Vol.1 Chemistry, Elsevier Applied Science Publishers London, S.223-265.

Degenhardt A., P. Winterhalter und E. Chou (2000): Separation of natural food colorants; Chemical Innovation 30-5, S.25-32.

Deutscher Kaffeeverband (2001): Alles aus der Welt des Kaffees; Homepage <http://www.kaffeeverband.de>, März 2001.

Doerffel K. (1987): Statistik in der analytischen Chemie; 3.Aufl., Verlag Chemie Weinheim, S.73-84.

DuBois G.E., D.E. Walters und M.S. Kelloggs (1993): Mechanism of human sweet taste and implications for rational sweetener design; in C.T. Ho und C.H. Manley (Hrsgg.): Flavor Measurement; ACS Washington, S.239-266.

Falbe J. und M. Regitz (1990): Römpp Chemie Lexikon Bd. 3., 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Feldman J.R., W.S. Ryder und J.T. Kung (1969): Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee; J. Agric. Food Chem 17, S.733-739..

Fliedner I. und F. Wilhelmi (1989): Grundlagen und Prüfverfahren der Lebensmittelsensorik; Behr's Verlag Hamburg.

Gautschi, M. und J.P. Schmid (1997): Chemical characterization of diketopiperazines in beer; J. Agric. Food Chem. 45, S.3183-3189

Ginz M., H.H. Balzer, A.G.W. Bradbury und H.G. Maier (2000): Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee; Eur. Food Res. Technol. 211, S.404-410.

Gorter K. (1911): Beiträge zur Kenntnis des Kaffees. 4. Abhandlung; Liebigs Ann. Chem. 379, S.110-130.

Grassmann W. und E. Wünsch (1958): Zur Darstellung von Carbobenzoxy-aminosäuren; Chem. Ber. 91, S.462-465.

Grosch W. (1996): Warum riecht Kaffee so gut; Chemie in unserer Zeit 30, S.126-133.

Gupta J. und S.P. Sen (1975): The cucurbitacins – a review; J. Plant Biochem. 2, S.12-28.

Habermehl G. und P.E. Hammann (1992): Naturstoffchemie; 1. Auflage, Springer Verlag Berlin, S.302-304.

Hauptmann S. (1985): Organische Chemie; 1.Auflage, Harri Deutsch Verlag, S.661-662.

Held R. (1991): Veränderungen der Chlorogensäuren im Kaffee beim Dämpfen, Rösten und Extrahieren; Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

Henle T. und H. Klostermeyer (1993): Determination of protein-bound 2-amino-6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid („pyrraline“) by ion exchange chromatography and photodiode array detection; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196, S.1-4.

Henle T., A.W. Walter und H. Klostermeyer (1993): Detection and identification of the cross-linking amino acids N^{ϵ} - and N^{π} -(2'-amino-2'-carboxy-ethyl)-L-histidine („histidinoalanine“, HAL) in heated milk products; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 197, S.114-117.

Henle T., A.W. Walter, R. Haeßner und H. Klostermeyer (1994): Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 199, S.55-58.

Henle T. und A. Bachmann (1996): Synthesis of pyrraline reference material; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 202, S.72-74.

Henle T., U. Schwarzenbolz und H. Klostermeyer (1997): Detection and quantification of pentosidine in foods; Z Lebens. Unters. Forsch. 204, S.95-98.

Hesse O. (1989): Beiträge zur Kenntnis der Chinongruppe. Liebigs Ann. Chem. 110, S-333-343.

Ho C.-T., H.-I. Hwang, T.-H. Yu und J. Zhang (1993): An overview of the Maillard reactions related to aroma generation in coffee; 15. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Montpellier 1993, ASIC Paris 1994, S.519-527.

Hofmann T. (1998): Acetylformoin – A Chemical Switch in the Formation of Colored Maillard Reaction Products from Hexoses and Primary and Secondary Amino Acids; J. Agric. Food Chem. 46, S.3918-3928.

Holscher W. (1991): Charakterisierung von Aroma-Impact-Verbindungen aus Arabica-Röstkaffee und ihre Bedeutung für die Röstkaffeealterung; Dissertation Universität Hamburg.

Holscher W., O.G. Vitzthum und H. Steinhart (1991): Charakterisierung von Aroma-Impact-Verbindungen aus Arabica-Röstkaffee mittels kombinierter GC/MS-Schnüffelanalyse; Lebensmittelchemie 45, S.12.

Hörhammer L. und H. Wagner (1959): Polyamidchromatographie; Pharm. Zeitg. 104, S.783-786.

Houben und Weyl (1974): Synthese von Peptiden; in Müller E. (Hrsg.): Methoden der organische Chemie 15/1, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4.Auflage, S.47-58.

Hucke, J. (1984): Chinasäurelacton im Kaffee; Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

Hughes W.J. und T.M. Thorpe (1987): Determination of Organic Acids and Sucrose in Roasted Coffees by Capillary Gas Chromatography; J. Food Sci. 52, S.1078-1083.

Hwang P.M., A. Verma, D.S. Bredt und S.H. Snyder (1990): Localization of Phosphatidylinositol Signaling Components in Rat Taste Cells: Role in bitter taste transduction; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, S.7395-7399.

Ishibashi N., K. Sadamori, O. Yamamoto, H. Kanehisa, K. Kouge, E. Kikuchi, H. Okai und S. Fukui (1987a): Bitterness of phenylalanine- and tyrosine-containing peptides; *Agric. Biol. Chem.* 51:12, S.3309-3313.

Ishibashi N., Y. Arita, H. Kanehisa, K. Kouge, H. Okai und S. Fukui (1987b): Bitterness of leucine-containing peptides; *Agric. Biol. Chem.* 51:9, S.2389-2394.

Ishibashi N., I. Ono, K. Kato, T. Shigenaga, I. Shinoda, H. Okai und S. Fukui (1988): Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides; *Agric. Biol. Chem.* 52:1, S.91-94.

Ishibashi N., K. Kouge, I. Shinoda, H. Kanehisa und H. Okai (1988): A mechanism for bitter taste sensibility in peptides; *Agric. Biol. Chem.* 52:3, S.819-827.

Ishibashi N., T. Kubo, M. Chino, H. Fukui, I. Shinoda, E. Kikuchi, H. Okai und S. Fukui (1988): Taste of proline-containing peptides; *Agric. Biol. Chem.* 52:1, S.95-98.

Jaenicke L. (1997): Reproduzierbare Protein-Analytik mit Coomassie Brilliantblau; *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 48, S.90-91.

Janson J.-C. und L. Rydén (1998): *Protein Purification*; John Wiley and Sons New York.

Jellinek G. (1981): *Sensorische Lebensmittelprüfung – Lehrbuch für die Praxis*; Verlag Doris & Peter Siegfried Pattensen.

Joos, P.E. (1995): Coupling matters. Electrospray and APCI-Mass Spectrometry; *LC-GC International* 8, S.92-95.

Jugel H., H. Wieser und H.-D. Belitz (1976): Auftreten von Bittergeschmack beim trockenen Erhitzen von Proteinen; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 161, S.267-269.

Kanjahn D., U. Jarms und H.G. Maier (1996): Hydroxymethylfurfural and Furfural in Coffee and Related Beverages I. Evaluation of the Method; Dtsch. Lebensm. Rundsch. 92, S.328-331.

Kawakami Y., S. Kunieda, A. Sato, Y. Takashima und T. Kanisawa (1995): Studies on volatile compounds in a series of roasted coffee beans. Changes of the amounts of volatile compounds and total sulfur; 16. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Kyoto 1995, ASIC Paris 1995, S.332-339.

Kiehne A. (1996): Untersuchungen über Polyphenole in Tee und Kaffee mittels HPLC und Thermospray HPLC-MS; Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

Kier L.B. (1972): Molecular theory of sweet taste; J. Pharm. Sci., 1972, 61, S. 1394

Kröplien W. (1963): Über Chlorogensäuren in der Kaffeebohne; Dissertation, Universität Hamburg.

Lawless H. (1982): Paradoxical adaptation to taste mixtures; Physiol. Behav. 29, S.149-152

Leloup, V., A. Louvrier und R. Liardon (1995): Degradation Mechanisms of Chlorogenic Acids During Roasting; 16. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Kyoto 1995, ASIC Paris, S.220-238.

Liardon R., U. Ott und N. Daget (1984): Analysis of Coffee Headspace Profiles by Multivariate Statistics; in P. Schreier (Hrsg.): Analysis of Volatiles, Walter de Gruyter Berlin, S.447-459.

Lottspeich F. und Zorbas H. (1998): Bioanalytik; Spectrum Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.

MacDonald, I.A. und R. Macrae (1985): The Determination of Amino Acids in Coffee Products; 11. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Lomé 1985, ASIC Paris 1986, S.333-340.

Macrae R. (1985): Nitrogenous Components; in R.J. Clarke und R. Macrae (Hrsgg.): Coffee Vol.1: Chemistry, Elsevier Applied Science Publishers London, S.115-152.

Maga J.A. (1978): Simple Phenol and Phenolic Compounds in Food Flavour; CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 10, S.323-372.

Maga J.A. (1990): Thermally produced bitter-tasting compounds; in R.L. Rouseff (Hrsg.): Bitterness in Foods and Beverages; Elsevier Science Publishers London, S.81-101.

Maier H.G. (1981): Kaffee; Paul Parey Berlin.

Maier H.G., C. Balcke und F.-C. Thies (1984): Säuren des Kaffees X. Einfluß des bitteren Geschmacks auf den sauren; Dtsch. Lebensm.-Rschau 80:12, S.367-369

Maier H.G. (1987): the acids of coffee; 12. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Montreux 1987, ASIC Paris 1988, S.229-237.

Maier H.G. (1989): Zum Stand der Forschungen über Kaffee; Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 43, S.25-33.

Maier H.G. (1993): Status of research in the field of non-volatile coffee components; 15. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Montpellier 1993, ASIC Paris 1994, S.567-576.

Maier H.G. (1999): Fortschritte auf den Gebieten der Chemie, der Analytik und der Pharmakologie des Kaffees; Dtsch.. Lebensm.-Rdschau 95, S.487-495.

Marshall C.E. (1983): The World Coffee Trade, Woodhead-Faulkner Cambridge.

McBurney D.H. und L.M. Bartoshuk (1973): Interactions between stimuli with different taste qualities; Physiol. Behav., 10, 1101-1106 (1973).

McCamey D.A., T.M. Thorpe und J.P. McCarthy (1990): Coffee Bitterness; in R.L. Rouseff (Hrsg.): Bitterness in Foods and Beverages; Elsevier Science Publishers London, S.169-182.

McLaughlin S.K., P.J. McKinnon und R.F. Margolskee (1992): Gustducin is a taste-cell-specific G Protein closely related to the Transducin; *Nature* 357, S.563-569.

Molina E., M. Ramos, A. Cifuentes und R. López-Fandino (1998): Characterization of cheese proteolysis by capillary electrophoresis and reverse-phase HPLC analyses of peptides; *Z. Lebensm. Unters. Forsch* 206, S.259-263.

Nagel C.W., I.W. Herrick und W.R. Graber (1987): Is Chlorogenic Acid bitter ?; *J. Food Sci.* 52:1, S.213.

Naim M., R. Seifert, B. Nürnberg, L. Grünbaum und G. Schulz (1994): Some taste substances are direct activators of G-Proteins; *Biochem. J.* 297, S.451-454.

Neumann R. und P. Molnar (1991): *Sensorische Lebensmitteluntersuchung*, Fachbuchverlag Leipzig.

Ney K.H. (1979): Kakao-Aroma .Bittere Verbindung als wesentliche Geschmacksbestandteile; *Gordian* 86/5, S.84-88.

Nishizawa M., R. Izuhara, K. Kaneko, Y. Koshihara und Y. Fujimoto (1988): 5-Lipoxygenase Inhibitors Isolated from *Gardenia Fructus*; *Chem. Pharm. Bull.* 36/1, S.87-95.

Nitecki D.E., B. Halpern, J.W. Westley (1968): A simple route to sterically pure diketopiperazines; *J. Org. Chem.* 33, S.864-866.

Otakiri K., Y. Nosho, I. Shinoda, H. Fukui und H. Okai (1985): Studies on a Model of Bitter Peptides Including Arginine, Proline and Phenylalanine Residue. I. Bitter taste of Di- and Tripeptides, and Bitterness Increase of the Model Peptides by Extension of the Peptide Chain; *Agric. Biol. Chem.* 49, S. 1019-1026.

Pabst H.M.E., F. Ledl and H.-D. Belitz (1984): Bitterstoffe beim Erhitzen von Prolin und Saccharose; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 178, S.356-360.

Pabst H.M.E., F. Ledl und H.-D. Belitz (1985): Bitterstoffe beim Erhitzen von Saccharose, Maltose und Prolin – 2. Mitteilung; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 181, S.386-390.

Pabst H.M.E., H. Lotter und H.-D. Belitz (1988): Bitterstoffe beim Erhitzen von Prolin und Saccharose – 3. Mitteilung; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, S.311-314.

Pedersen G.A., G.K. Mortensen und E.H. Larsen (1994): Beverages as a source of toxic trace element intake; Food Addit. Contam. 11, S.351-363.

Pickenhagen W., P. Dietrich, B. Keil, J. Polonsky, F. Nouaille und E. Lederer (1975): Identification of the Bitter Principle of Cocoa; Helv. Chim. Acta 58, S.1078-1086.

Price S. (1973): Phosphodiesterase in Tongue Epithelium: Activation by Bitter Taste Stimuli; Nature 241, S.54-55.

Pypker J. und H. Brouwer (1969): Headspace Analysis of Less Volatile Constituents of Coffee; 4. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffeechemie, Amsterdam 1969, ASIC Paris 1970, S.122-130.

Reichstein T. und H. Staudinger (1955): The aroma of coffee; Perfum. Essent. Oil Rec. 46, S.86-88.

Rizzi G. P. (1989): Heat-induced Flavor Formation from Peptides; in T.H. Parliment, R.J. McGorin und C.T. Ho (Hrsgg.): Thermal Generation of Aromas; American Chemical Society Washington DC 409, S.172-181

Rouseff R.L. (1990): Bitterness in Food Products: An Overview; in R.L. Rouseff (Hrsg.): Bitterness in Foods and Beverages; Elsevier Science Publishers London, S.1-14.

Ruiz-Avila L., S.K. McLaughlin, D. Wildman, P.J. McKinnon, A. Robichon, N. Spickofsky und R.F. Margolskee (1995): Coupling of Bitter Receptor to Phosphodiesterase Through Transducin in Taste Receptor Cells; Nature 376, S.80-85.

Sabir, M.A., F.W. Sosulski und A.J. Finlayson (1974): Chlorogenic Acid-Protein Interactions in Sunflower; J. Agr. Food Chem. 22, S.575-578.

Sakamura S., K. Furukawa und T. Kassai (1978): Bitter diketopiperazines in roasted malts for beer brewing; Agric. Biol. Chem. 42, S.607-612.

Schifferstein H.N.J. und J.E.R. Frijters (1992): Two-Stimulus versus one-stimulus procedure in the framework of functional measurement: a comparative investigation using quinine HCl/NaCl mixtures. Chem. Senses 17, S.127-150.

Schiffmann S.S., N.S. Suggs, M.L. Losee, L.A. Gatlin, W.C. Stagner und R.M. Bell (1995): Effect of Lipid-Derived Second Messengers on Electrophysiological Taste Responses in Gerbil; Pharmacol. Biochem Behav. 52, S. 49-58.

Scholz-Böttcher B.M. und H.G. Maier (1991); Isomers of quinic acid and quinides in roasted coffee: Indicators for the degree of roast ?; 14. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, San Francisco 1991, ASIC Paris 1992, S.220-229.

Schrader K., Kiehne A., Engelhardt U.H. und H.G. Maier (1996); Determination of Chlorogenic Acids with Lactones in Roasted Coffee. J. Sci. Food Agric. 71, S.392-398.

Semmelroch P. und W. Grosch (1995): Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples; Lebensm.- Wiss. u. Technol. 28, S.310-313.

Semmelroch P. und W. Grosch (1996): Studies on character impact odorants of coffee brews; J. Agric. Food Chem. 44, S.537-543.

Shallenberger R.S. und T.E. Acree (1967): Molecular Theory of Sweet Taste; Nature 216, S.480-482.

Shallenberger R.S. (1996): The AH,B glycochore and general taste chemistry; Food Chem. 56, S.209-214.

Shibamoto T, K. Harada, S. Mihara, O. Nishimura, K. Yamaguchi, A. Aitoku und T. Fukada (1981): Application of HPLC for evaluation of coffee flavor quality; in: G. Charalambous und G. Inglett (Hrsgg.): The Quality of Foods and Beverages – Vol.2, Academic Press New York, S.312-334.

Shibamoto T. (1983): Heterocyclic compounds in browning and browning/nitrite model systems: occurrence, formation mechanisms, flavor characteristics and mutagenic activity; in G. Charalambous und G. Inglett (Hrsgg.): Instrumental Analysis of Foods – Vol.1, Academic Press New York, S.229-278.

Shibamoto T. (1991): An Overview of coffee Aroma and Flavor Chemistry; 14. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, San Francisco 1991, ASIC Paris 1992, S.107-116.

Shigematsu H., S. Shibata, T. Kurata, H. Kato und M. Fujimaki (1975): 5-Acetyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizines and 5,6,7,8-Tetrahydroindolizidin-8-ones, Odor Constituents Formed on Heating L-Proline with D-Glucose; J. Agr. Food Chem. 23, S.233-237.

Silwar R., H. Kamperschröer und R. Tressl (1987): Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen des Röstkaffeearomas – Quantitative Bestimmung wasserdampfflüchtiger Aromastoffe; Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 10, S.176-187.

Silwar R. und C. Lüllmann (1993): The aroma composition of the coffee beverage. Quantitative determination of steam-volatile aroma constituents; 15. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Montpellier 1993, ASIC Paris 1994, S.873-879.

Smith A.W. (1985): Introduction; in R.J. Clarke und R. Macrae (Hrsgg.): Coffee Vol.1 Chemistry, Elsevier Applied Science Publishers London, S.1-41.

Speer K. und P. Mischnick (1989): 16-O- Methylcafestol – ein neues Diterpen im Kaffee; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 189, S.219-222.

Sonderheimer E. (1957): The isolation and identification of 3-methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin; J. Amer. Chem. Soc. 79, S.5036-5039.

Striem B.J., U. Pace, V. Zehai, M. Naim und D. Lancet (1989): Sweet tastants stimulate adenylate-cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue, *Biochem J.*, 260,(1989) 121-126.

Stryer L. (1991): *Biochemie*; 4. Auflage, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg Berlin NewYork, S.1041-1078.

Sturm, R. (1983): Untersuchungen phenolischer Kaffeeinhaltsstoffe im Hinblick auf Veränderungen bei der Wasserdampfbehandlung von Rohkaffee; Dissertation, Universität Hamburg.

Takahashi K., M. Tadenuma, K. Kitamoto und J. Sato (1974): Bitter diketopiperazines in roasted malts for beer brewing; *Agric. Biol. Chem.* 38, S.927-932.

Tanimoto S., M. Watanabe und S. Arai (1992): Bitter Flavor of Protein Hydrolysates and Synthetic Peptides; in G. Charalambous (Hrsg.): *Off-Flavor in Foods and Beverages*; Elsevier Science Publishers London, S.547-566.

Telek L., F.W. Martin und R.M. Ruberté (1974): Bitter compounds in tubers of *Dioscorea bulbifera* L.; *J. Agr. Food Chem.* 22, S.332-334.

Thaler, H. und R. Gaigl (1963): Untersuchungen an Kaffee und Kaffee-Ersatz, VII. Mitteilung – Die Zusammensetzung des Eiweißes des Rohkaffees; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 119, S.10-25.

Tressl, R., M. Holzer, H. Kamperschröer (1982): Bildung von Aromastoffen in Röstkaffee in Abhängigkeit vom Gehalt an freien Aminosäuren und reduzierenden Zuckern; 10. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Salvador 1982, ASIC Paris 1983, S.279-292.

Tressl R., B. Helak, H. Köppler und D. Rewicki (1985): Formation of 2-(1-Pyrrolidiny)-2-cyclopentenones and Cyclopent(b)azepin-8(1H)-ones as Proline specific Maillard Products; *J. Agric. Food Chem.* 33, S.1132-1137.

Tressl R., K.G. Grünewald, E. Kersten und D. Rewicki (1985): Formation of Pyrroles and Tetrahydroindolizin-6-ones as Hydroxyproline-Specific Maillard Products from Glucose and Rhamnose; J. Agric. Food Chem. 33, S.1137-1142.

Tressl R. (1989): Formation of Flavor Components in Roasted Coffee; in T.H. Parliment, R.J. McGorin und C.-T. Ho (Hrsg.): Thermal Generation of Aromas, ACS Symposium Series 409, Washington, S. 285-301.

Trugo L.C. und R. Macrae (1984): A Study on the Effect of Roasting on the Chlorogenic Acid Composition of Coffee using HPLC; Food Chemistry 15, S.219-227.

Van der Heijden A., H. van der Wel und H.G. Peer (1985a): Structure-activity-relationships in sweeteners. 1. Nitroanilines, Sulfamates, Oximes, Isocumarins and Dipeptides; Chem. Senses 10, S.57-72.

Van der Heijden A., H. van der Wel und H.G. Peer (1985b): Structure-activity-relationships in sweeteners. 2. Saccharins, Acesulfames, Chlorosugars, Tryptophans and Ureas; Chem. Senses 10, S.73-88.

Vitzthum O.G. (1976): Chemie und Bearbeitung des Kaffees; in O. Eichler (Hrsg.): Kaffee und Coffein; Springer Verlag Berlin, S.3-64.

Vitzthum O.G., C. Weisemann, R. Becker und H.S. Köhler (1990): Identification of an aroma key compound in Robusta coffees; Café Cacao Thé 34, S.27-33.

Voilley A., F. Sauvageot und D. Durand (1975): Influence, sur l'amertume d'un café-boisson, de quelques paramètres d'extraction; 8. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Abidjan 1975, ASIC Paris 1977, S.251-259.

Walters D.E. (1996): How are bitter and sweet tastes related; Trends in Food Science and Technology 7, S.399-402.

Warmke R. und H.-D. Belitz (1993): Influence of glutamic acid on the bitter taste of various compounds; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 197, S.132-133

Watkins N.G., S.R. Thorpe und J.W. Baynes (1985): Glycation of amino-groups in protein. Studies on the specificity of modification of RNASE by glucose; J. Biol. Chem. 260, S.10629-10636.

Weers M., H. Balzer, A. Bradbury und O.G. Vitzthum (1995): Analysis of acids in coffee by capillary electrophoresis; 16. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Kyoto 1995, ASIC Paris 1995, S.218-223.

Weidner M. (1999): Purinalkaloide und Methylharnsäuren im Kaffee; Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

Wieser H. und H.-D. Belitz (1975): Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 159, S.65-72.

Winter M. und K. Herrmann (1984): Analysis of Hydrocinnamic Acid Esters and their Glycosides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography after Polyamid Separation; J. Chromatogr. 315, S. 243-251

Wong G.T., K.S. Gannon und R.F. Margolskee (1996): Transduction of bitter and sweet taste by gustducin; Nature 381, S.796-800.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Michael Ginz
Geburtsdatum	05.08.1973
Geburtsort	Bremen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1980 – 07/1984	Grundschule Grasberg
08/1984 – 07/1986	Orientierungsstufe Worpswede
08/1986 – 05/1993	Gymnasium Lilienthal

Studium

10/1993 – 01/1999	Studiums der Lebensmittelchemie an der TU Braunschweig Abschluß: Erstes Staatsexamen in Lebensmittelchemie
07/1998 – 10/1998	Wissenschaftliche Abschlußarbeit, Bildung von Carbonsäuren im Röstkaffee, Kraft Jacobs Suchard R&D, München

Promotion

11/1998	Beginn der Promotion am Institut für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Arbeit
06/2001	Abschluß des Promotionsverfahrens - Disputation